

Untersuchungen zur Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität in Liquor und Serum  
bei Patienten mit demenziellen Erkrankungen im Vergleich zu Gesunden

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Susan Reichel  
geboren am 05.04.1979 in Schwerin

Erster Gutachter:      Prof. Sauer, Jena  
.....

Zweiter Gutachter:    Prof, Klinger, Jena  
.....

Dritter Gutachter:     Prof. Wagner-Gattaz, Sao Paulo  
.....

Tag der öffentlichen Verteidigung:      07.01.2008  
.....

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
A $\beta$	Amyloid beta
abh.	abhängig
AD	Alzheimer Demenz
ADDTC	Alzheimer Disease Diagnostic and Treatment Center
ADRDA	Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
AIREN	Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neuroscience
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of Variance)
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Präkursor-Protein
ARISTO	Aristolochic Säure
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AVD	Demenz vom Mischtyp aus Alzheimer und Vaskulärer Demenz
BAB	4-Bromophenacylbromid
BEL	Bromoenol Lacton
C	Kohlenstoff
°C	Temperatur in Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CAMCOG	Cambridge Cognitive Examination
CERAD	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease
CJD	Creutzfeld-Jacob-Demenz
CoA	Coenzym A
cPLA <sub>2</sub>	zytosolische PLA <sub>2</sub>
CT	Computertomogramm
d	Tag
DP	Demenz bei Morbus Parkinson
EEG	Elektroenzephalogramm
EGTA	Ethylenebis(oxyethylene-nitrilo)tetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
EW	Eiweiß
fAD	Familiäre Alzheimer Demenz
Fas-R	Fas-Rezeptor
FFI	Fatale-Familiäre-Insomnie
FFS	Freie Fettsäure
FTD	Frontotempotale Demenz
ges.	gesamt
GPC	Glycerophosphocholin
GTP	Guanosin-Triphosphat
H <sub>2</sub>	Wasserstoff
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine- N'-2-ethane-sulfonic acid
HNE	Hydroxy-2-nonenal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPTLC	hochauflösende Dünnschichtchromatografie (high performance thin layer chromatography)

ICD	Diagnosenmanual der Weltgesundheitsorganisation (International Classification of Diseases)
IL	Interleukin
ILI	Integrierte Licht Intensität
iPLA <sub>2</sub>	kalziumunabhängige (independent) PLA <sub>2</sub>
kDa	Molekulargewicht in Kilodalton
KG	Kontrollgruppe
Korr	Korrelation
Ko-S	Korsakow-Syndrom
L	Ligand
LKD	Lewy-Körper-Demenz
Lp-PLA <sub>2</sub>	Lipoprotein assoziierte Phospholipase A <sub>2</sub>
LTP	Langzeitpotenzierung
Lyso-NBD	NBD-PC nach Abspaltung des NBD-X
Lyso-PC	Lysophosphatidylcholin
MCI	Mild cognitive impairment
mg	Gewicht in Milligramm
mgEW/ml	Serumeiweisskonzentration in Milligramm Eiweiß pro Milliliter
ml	Volumen in Milliliter
mM	Stoffmenge in Millimol
MMST	Mini-Mental-Status-Test
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NADPH	Reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphats
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium-Kalium-Pumpe
NBD-PC	NBDC <sub>6</sub> -HPC <sup>®</sup> (= 2-(6-(7-nitro-benz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino-hexanoyl-1-hexa-decanoyl-sn-glycero-3-phospho-choline)
NBD-X	fluorochrome modifizierte Fettsäure des NBD-PC
neg.	negativ
n <sub>g</sub>	Anzahl der männlichen und weiblichen Probanden
NINCDS	National Institute of Neurological and Communicative Disorders
NINDS	National Institute of Neurological Disorders and Stroke
n <sub>m</sub>	Anzahl der männlichen Probanden
NMDA	n-Methyl-D-Aspartat
np	nicht paralleisiert
NPH	Demenz bei Normaldruckhydrozephalus
n.s.	nicht signifikant
NSAID	non steroidal anti-inflammatory drug
n <sub>w</sub>	Anzahl der weiblichen Probandinnen
OBAA	4-(4-Octadecylphenyl)-4-Oxobutenoic Säure
p	parallelisiert
PACOCF <sub>3</sub>	Palmityltrifluoromethylketone
PAF	plättchenaktivierender Faktor
Pat.	Patient
PC	Phosphatidylcholin
PDE	Phosphodiester
PED <sub>6</sub> <sup>®</sup>	(N-((6-(2,4-dinitro-phenyl) amino-hexyl)-2-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-pentanoyl)-1-hexadecanoylsn-glycero-phosphatidyl-ethanol-amine triethylammonium salt)
PG	Patientengruppe
pH	Wasserstoffionenkonzentration (pondus Hydrogenii)

PKC $\alpha/\epsilon$	Proteinkinase C $\alpha/\epsilon$
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
pM	picoMol
PME	Phosphomonoester
<sup>31</sup> P-MRS	<sup>31</sup> Phosphor-Magnetresonanz-Spektroskopie
pos.	positiv
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids)
r	Stichproben-Maßkorrelationskoeffizients
R	Rezeptor
REF	Referenz
ROS	reaktive oxygene Spezies
RSA	Rinderserumalbumin
sn-1	erstes Kohlenstoffatom des Glycerinmoleküls
sn-2	zweites Kohlenstoffatom des Glycerinmoleküls
sn-3	drittes Kohlenstoffatom des Glycerinmoleküls
sPLA <sub>2</sub>	sekretorische PLA <sub>2</sub>
SPSS	Software zur statistischen Auswertung (Statistical Package for the Social Sciences)
Tab	Tabelle
TIF	Dateiformat (Tag Image File)
TLC	Dünnschichtchromatografie (Thin Layer Chromatography)
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TRIS	Tris Hydroxymethylaminoethane
u. a.	unter anderem
$\mu$ l	Volumen in Mikroliter
U/min	Drehzahl in Umdrehungen pro Minute
unabh	unabhängig
UV	Ultraviolett
v. a.	vor allem
VD	Vaskuläre Demenz
vgl.	vergleiche
vs.	versus
ZNS	Zentrales Nervensystem
Ø	Mittelwert

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Einteilung und Charakterisierung der Demenzen .....	1
1.1.1 Epidemiologie demenzieller Erkrankungen .....	1
1.1.2 Alzheimer Demenz (AD) .....	3
1.1.3 Vaskuläre Demenz (VD) .....	8
1.1.4 Demenz vom Mischtyp Alzheimer- und Vaskuläre Demenz (AVD) .....	10
1.1.5 Weitere untersuchte Demenzformen .....	11
1.2 Neuronale Membranen, Phospholipide und PLA <sub>2</sub> im Stoffwechselgeschehen des Zentralen Nervensystems .....	13
1.2.1 Aufbau neuronaler Membranen .....	14
1.2.2 Gruppierung der PLA <sub>2</sub> .....	16
1.2.3 Die funktionelle Bedeutung der Phospholipide und der PLA <sub>2</sub> im ZNS .....	17
1.2.4 Regulation der PLA <sub>2</sub> .....	24
1.2.5 Indirekte Stoffwechseleffekte .....	25
1.3 Klinische Studien zu PLA <sub>2</sub> und Membranstoffwechsel bei Demenz .....	27
1.3.1 Veränderungen der PLA <sub>2</sub> -Aktivität .....	27
1.3.2 Veränderungen des Membranstoffwechsels .....	32
<b>2 ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>34</b>
<b>3 METHODIK .....</b>	<b>35</b>
3.1 Patienten .....	35
3.2 Untersuchungsmaterialien .....	40
3.3 Methode .....	41
3.4 Differenzierung der iPLA <sub>2</sub> .....	45
3.5 Identifikation der iPLA <sub>2</sub> in Serum und Liquor .....	48
3.6 Bearbeitung der Messdaten .....	53
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>54</b>
4.1 Epidemiologische Betrachtung der Stichprobe .....	54
4.2 Untersuchungen zu den drei Hauptdemenzformen (AD, VD, AVD) .....	55
4.2.1 Gruppenvergleiche der iPLA <sub>2</sub> -Aktivität .....	55
4.2.2 Einfluss des Schweregrades der Erkrankung auf die iPLA <sub>2</sub> -Aktivität .....	61
4.2.3 Zusammenhang zwischen der iPLA <sub>2</sub> -Aktivität in Serum und Liquor .....	62
4.2.4 Alter und iPLA <sub>2</sub> -Aktivität .....	63
4.2.5 Geschlechtsbedingte Unterschiede .....	64
4.2.6 Einfluss von Medikamenten auf die Aktivität der iPLA <sub>2</sub> .....	64
4.3 Gruppen- und Einzelvergleiche der iPLA <sub>2</sub> -Aktivität bei weiteren Demenzformen .....	65
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>70</b>
5.1 Stichprobe und Methode .....	70
5.2 Besprechung der Gruppenvergleiche .....	72
5.2.1 iPLA <sub>2</sub> -Aktivität bei AD .....	72
5.2.2 iPLA <sub>2</sub> -Aktivität bei VD .....	84
5.3 Zusammenhang zwischen der iPLA <sub>2</sub> -Aktivität in Serum und Liquor .....	86
5.4 iPLA <sub>2</sub> -Aktivität und Alter .....	88
5.5 iPLA <sub>2</sub> -Aktivität und Geschlecht .....	89
5.6 iPLA <sub>2</sub> -Aktivität und Medikamenteneinnahme .....	90
5.6.1 ASS .....	90
5.6.2 Acetylcholinesterasehemmer .....	90
5.7 Bedeutung der Veränderung der iPLA <sub>2</sub> -Aktivität für weitere Demenzformen .....	91
<b>6 SCHLUSSFOLGERUNGEN .....</b>	<b>92</b>

<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>XX</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>XXI</b>
<b>ANHANG .....</b>	<b>XXII</b>

## Zusammenfassung

Bezüglich der pathophysiologischen Mechanismen der Demenzerkrankungen existieren in der Literatur verschiedene Hypothesen. Darunter befanden sich in den vergangenen Jahren wiederholt Aussagen zum Phospholipidmetabolismus neuronaler Membranen. Dessen Alteration wurde bereits 1994 von der Arbeitsgruppe um Horrobin et al. im Rahmen der „Membran-Phospholipid-Hypothese“ als potentielle Ursache von Störungen der Membranstruktur und -fluidität sowie von Störungen verschiedener Transmitter- und Rezeptorsysteme angeführt (Horrobin et al. 1994, Horrobin 1998). Ein für den Erhalt physiologischer Membranreparatur- und Membranumbauprozesse maßgebliches Schlüsselenzym ist die kalziumunabhängige Phospholipase A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>). Ihre Aktivitätsuntersuchung bei Patienten mit verschiedenen demenziellen Erkrankungen, wie der Alzheimer Demenz (AD), der Vaskulären Demenz (VD) und der Demenz vom Mischtyp aus AD und VD (AVD), ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Dabei erfolgte die iPLA<sub>2</sub>-Untersuchung erstmals nicht nur im Blut, sondern auch im Liquor. Bis dato liegen lediglich Untersuchungen an Thrombozyten und postmortalem Hirngewebe vor, die bis auf eine kleine Studie von Stephenson et al. alle eine Aktivitätsabnahme der PLA<sub>2</sub> bei AD zeigten (Gattaz et al. 1996, Gattaz et al. 2004, Ross et al. 1998, Talbot et al. 2000, Stephenson et al. 1996). Untersuchungen der PLA<sub>2</sub>-Aktivität bei anderen Demenzformen als der AD wurden bisher nach unserem Kenntnisstand nicht durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität von 58 Patienten, davon 16 mit AD, 12 mit VD, 15 mit AVD und explorativ von 15 Patienten mit weiteren Demenzformen (Frontotemporale Demenz, Lewy-Körper-Demenz, Demenz bei Normaldruckhydrozephalus, Korsakow-Syndrom, Creutzfeld-Jacob-Demenz, Demenz bei Morbus Parkinson, Fatale Familiäre Insomnie) untersucht und jeweils mit 19 Kontrollpersonen verglichen. Zur Messung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität wurde eine fluorometrische Bestimmungsmethode unter der Verwendung des iPLA<sub>2</sub>-sensitiven Substrats NBDC<sub>6</sub>-HPC<sup>®</sup> angewandt, bei der die Reaktionsprodukte mittels Dünnschichtchromatographie getrennt und die jeweiligen Fluoreszenzen digital gemessen und quantifiziert werden.

Die Ergebnisse zeigten in den Liquoruntersuchungen nicht nur eine signifikante Verminderung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität bei Patienten mit AD und AVD, sondern auch eine tendenzielle Aktivitätsminderung des Enzyms bei Patienten mit VD. Unter den anderen Demenzformen zeigte sich eine tendenzielle Minderung der Liquor-iPLA<sub>2</sub>-Aktivität nur bei der Frontotemporalen Demenz. In den Serumuntersuchungen fanden sich keine Unterschiede



zwischen den einzelnen Gruppen. Die vermutete Korrelation zwischen den Liquor- und Serumwerten ließ sich nicht bestätigen, obwohl im Vorfeld der Nachweis der Übereinstimmung des in Liquor und Serum gemessenen Enzyms geführt werden konnte. Der vermutete Zusammenhang zwischen der Schwere der Erkrankung und der iPLA<sub>2</sub>-Beeinträchtigung konnte nur als Tendenz mit Aktivitätsminderung in schwereren Erkrankungsstadien gezeigt werden. Ein Einfluss von Alter, Geschlecht und der Einnahme von ASS 100 bzw. Acetylcholinesterasehemmern auf die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität war nicht eruierbar. Da die iPLA<sub>2</sub> wesentlich in den Ab- und Umbau der Membranphospholipide involviert ist, deuten die vorliegenden Ergebnisse auf einen verminderten Phospholipidturnover, aber auch auf eine verminderte regenerative Aktivität hin. Dies trifft vor allem auf die Alzheimer Demenz und die Demenz vom Mischtyp zu, ist in geringerem Maße aber auch bei der Vaskulären Demenz nachweisbar. Abgesehen von Membranrepair- und Membranremodelingprozessen ist die Verflechtung von Neurodegeneration und iPLA<sub>2</sub>-Funktion vielschichtig und komplex. Neben der Regulation von Membranfluidität und -integrität taucht die iPLA<sub>2</sub> im Zusammenhang mit cholinerg Neurotransmission, Amyloidogenese, Entstehung von Gedächtnisdefiziten (Langzeitpotenzierung) und Abwehr von oxidativem Stress auf. Vieles spricht darüber hinaus für einen Zusammenhang zwischen der hier gefundenen iPLA<sub>2</sub>-Verminderung und dysapoptotischen Vorgängen.

Auffällig ist die fehlende Assoziation von Liquor- und Serumbefunden, deren abschließende Klärung noch aussteht. Ausschließlich zentral ablaufende Veränderungen, die sich nur im Liquor, aber nicht in dem großen Kompartiment des Blutserums abbilden lassen, schrankenbedingte Kompartimentierungsphänomene und periphere Einflussfaktoren auf die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Serum bilden mögliche Erklärungsansätze. Aufgrund dieser Unsicherheit sollte in weiterführenden Untersuchungen vorzugsweise Liquor als Untersuchungsmedium gewählt werden.

Neben den Hauptergebnissen der Arbeit geben die angedeuteten Befunde bei Patienten mit Vaskulärer und Frontotemporaler Demenz Anlass zu ergänzenden Untersuchungen an größeren Stichproben. Gleiches gilt für die Befunde bezüglich der Schwere der Erkrankung. Zum Verständnis der iPLA<sub>2</sub>-Veränderungen in klinischen Populationen sind außerdem weitere Studien zu grundlegenden Regulationsmechanismen der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität notwendig.

Da Störungen im Phospholipidmetabolismus der Substitution mit Omega-3-Fettsäuren zugänglich sind, wären aus der Aufklärung der zugrunde liegenden Pathophysiologie Fortschritte für die Prävention, Diagnostik und Therapie von Demenzerkrankungen insbesondere mit „Alzheimer-Pathologie“ zu erhoffen (Peet und Horrobin 2002, Ross 2000).

# 1 Einleitung

Nach der 10. koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung des Bundes 2006 wird die über 65-jährige Bevölkerung in Deutschland bis zum Jahr 2050 von derzeit 14,1 Millionen voraussichtlich um 30 % auf circa 20,3 Millionen anwachsen (<http://www.gbe-bund.de>). Vor diesem Hintergrund ist eine starke Zunahme chronischer, altersassoziierter Erkrankungen zu erwarten. Die Demenzen spielen in dieser Erkrankungsgruppe eine wesentliche Rolle. Nach Bickel et al. wird die Anzahl von Patienten mit demenziellen Erkrankungen in Deutschland von im Jahr 2000 geschätzten 935000 auf etwas das 2,5fache und damit auf circa 2,3 Millionen Fälle im Jahr 2050 zunehmen (Bickel 2000). Die Erforschung der grundlegenden pathophysiologischen Veränderungen der demenziellen Erkrankungen ist daher von außerordentlichem Interesse. Nur durch genaue Kenntnis dieser Mechanismen ist es möglich, langfristig effiziente präventive und therapeutische Maßnahmen zu entwickeln. Vielfach wurden bei Patienten mit demenziellen Erkrankungen Veränderungen im Phospholipid-metabolismus gefunden, welche im Kapitel 1.3.2 genauer dargestellt sind. Hierdurch rückte die Untersuchung von Schlüsselenzymen des Phospholipidstoffwechsels ins Zentrum des Interesses. Wesentliches Schlüsselenzym des Phospholipidabbaus ist die Phospholipase A<sub>2</sub>, die auch Gegenstand der vorliegenden Untersuchung ist.

## 1.1 Einteilung und Charakterisierung der Demenzen

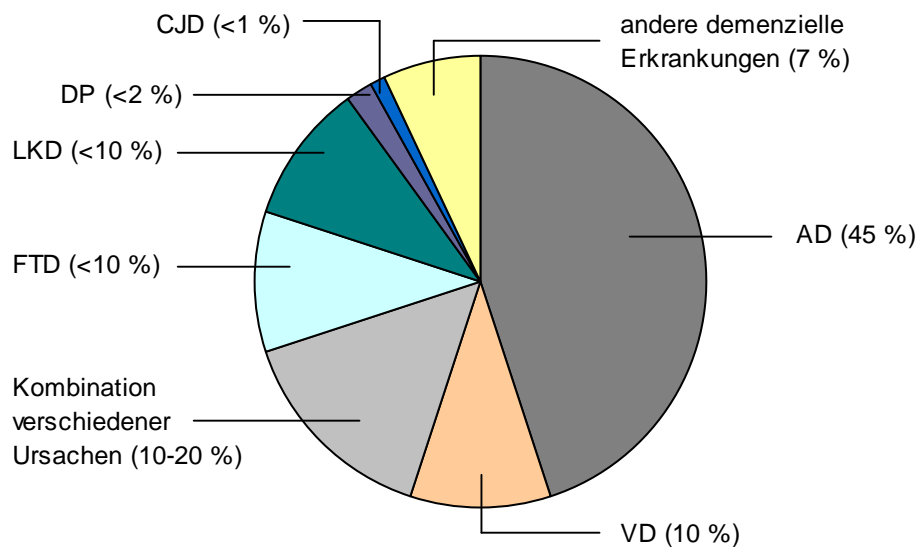
### 1.1.1 Epidemiologie demenzieller Erkrankungen

Die Prävalenz demenzieller Erkrankungen steigt zwischen dem 65sten und 90sten Lebensjahr annähernd exponentiell mit einer Verdopplung nach jeweils fünf Altersjahren an. Oberhalb von 90 Jahren scheint sich der Anstieg abzuswächen. Die Gesamtprävalenz bei den über 65-Jährigen liegt bei 7 %. Das entsprach im Jahr 2000 in Deutschland circa 935000 Erkrankten. Mehr als die Hälfte aller Krankheitsfälle sind in der Altersgruppe der 80- bis 89-Jährigen zu finden, rund 15 % bei den über 90-Jährigen (Bickel 2005, Bickel 2000). Die präsenilen Demenzen (Altersbereich zwischen 40 und 64 Jahren) zeigen eine Prävalenz von weniger als 0,1 %, was in Deutschland einer Gesamtzahl von circa 20000 Betroffenen entspricht und damit nur 3 % des Krankenbestandes (Bickel 1999).

70 % der Demenzerkrankungen entfallen auf Frauen, was sowohl auf eine Überrepräsentation von Frauen in der Altenbevölkerung als auch auf eine erhöhte Inzidenz und Prävalenz der Alzheimer Demenz bei Frauen zurückzuführen ist (Webber et al. 2004).

Die jährliche Inzidenzrate von Demenzerkrankungen wird zwischen 1,4 und 3,2 % angegeben, was circa 200000 neuen Krankheitsfällen pro Jahr in Deutschland entspricht (Jorm und Jolley 1998, Bickel 2005, Fratiglioni et al. 2000).

Einen Überblick über den Anteil der einzelnen Unterformen der Demenzen am Gesamtspektrum gibt Abbildung 1.



**Abb. 1** Anteil demenzieller Erkrankungen am Gesamtspektrum nach Angaben von Staehelin 2004

AD = Alzheimer Demenz, VD = Vaskuläre Demenz, FTD = Frontotemporale Demenz, LKD = Lewy-Körper Demenz, DP = Demenz bei Morbus Parkinson, CJD = Creutzfeld-Jacob-Demenz

Diese Zahlen verdeutlichen, dass demenzielle Erkrankungen zunehmend die Bedeutung von Volkskrankheiten erreichen. Nicht nur die verminderte Lebensqualität der Betroffenen, sondern auch gesundheitspolitische und gesundheitsökonomische Folgen geben dringend Anlass zur Erforschung effektiver präventiver, diagnostischer und therapeutischer Optionen. Diesem Anliegen folgt die vorliegende Untersuchung.

### 1.1.2 Alzheimer Demenz (AD)

#### Medizingeschichtlicher Rückblick

Eine der häufigsten Demenzformen wurde erstmals 1906 von Alois Alzheimer bei einer Patientin mit früh beginnenden Gedächtnis- und Funktionsdefiziten beschrieben – heute bekannt als Alzheimer Demenz. Diese ist histopathologisch von extrazellulären Plaques und intrazellulären neurofibrillären Degenerationen begleitet, die nachfolgend genauer erläutert werden.

#### Epidemiologie

Die Alzheimer Demenz ist in den westlichen Ländern die häufigste Ursache einer Demenz. An ihr leiden in Deutschland etwa 650000 Personen. Die Hälfte der Erkrankten sind älter als 85, nur rund 10 % sind jünger als 75 Jahre (Bickel 2000). Bei dieser Schätzung sind die Fälle präseniler AD inbegriffen, deren Zahl in Deutschland vermutlich unter 10000 Erkrankten liegt (Newens et al. 1993).

Die Einjahresinzidenz liegt für die gesamte Altenbevölkerung bei 1 % (entspricht in Deutschland circa 121000 Neuerkrankungen), charakterisiert durch einen exponentiellen Anstieg von weniger als 0,2 % bei den 65- bis 69-Jährigen (entspricht in Deutschland circa 6200 Neuerkrankungen) auf mehr als 6 % bei den über 90-Jährigen (entspricht in Deutschland circa 18.000 Neuerkrankungen) (Bickel 2000). Die Inzidenz für die präsenile Alzheimer Demenz liegt in Deutschland zwischen 1500 und 3000 Personen (Rocca et al. 1998).

#### Klinisches Erscheinungsbild und Verlauf

Die AD verläuft häufig in drei Phasen, mit einer relativ geringen Progression zu Beginn (bis zu ca. zwei Jahren), schnellerem Fortschreiten in einer mittleren Phase und wieder geringerem in einer Spätphase mit schweren Defiziten. Der Krankheitsverlauf erstreckt sich über einen Zeitraum von einem Jahr bis zu zehn Jahren.

Der Beginn der AD ist in der Regel schleichend und umfasst vor allem Störungen des Neugedächtnisses, wobei ältere Gedächtnisinhalte meist vollständig erhalten sind und häufig vermehrt wiedergegeben werden. Nur selten finden sich bereits Auffälligkeiten anderer neurokognitiver Teilbereiche, wie semantische Störungen (insbesondere Wortfindungsstörungen) und visuokonstruktive Defizite. Hinzu kommen leichte Verhaltensänderungen, wie nachlassende Aktivität, sozialer Rückzug oder vermehrtes Hilfesuchverhalten. Die genannten Symptome werden oft im Zusammenhang mit äußeren Veränderungen, wie dem Tod stützender Angehöriger oder einer neuen Umgebung, erstmals klinisch auffällig. Das

Frühstadium einer Alzheimer Demenz ist oft von heftigen Stimmungsveränderungen begleitet und dann unter Umständen nur schwer von einer kognitiven Störung im Rahmen einer Depression unterscheidbar. Bei depressiver Grunderkrankung spricht man von einer depressiven Pseudodemenz.

Im fortschreitenden Krankheitsverlauf zeigt sich dann eine langsame, kontinuierliche Verschlechterung der Symptome. Zusätzlich zur anterograden Gedächtnisstörung kommt es zur retrograden Amnesie und es treten weitere kognitive Einschränkungen wie ausgeprägte Wortfindungsstörungen, Apraxie, Alexie, Agraphie, Akalkulie, schwere Störungen der Visuokonstruktion und der räumlichen Orientierung und agnostische Störungen (z. B. Prosopagnosie) auf. Schwankungen der Symptome z. B. mit einer Zunahme unter Stress sind möglich.

Neben den genannten Befunden zeigen sich Störungen des Erlebens und Verhaltens bei bis zu 70 % der Betroffenen, woraus sich auch für die Angehörigen erhebliche Belastungen ergeben können. Anfangs kommt es hauptsächlich zu depressiven Anpassungsstörungen auf selbst-erkannte Defizite, später dann zu vermehrter Unruhe (bei circa 70 % der Patienten in fortgeschrittenen Stadien), apathischem Syndrom (20 %), Wahnsymptomen, Halluzinationen (v. a. visuell, bei 10-17 %) und Störungen des Schlaf-Wach-Rhythmus.

Auch zeigen sich zahlreiche neurologische Symptome. Häufig kommt es zur Ausbildung von Primitivreflexen, gesteigerten Muskeleigenreflexe und Bradykinese, später häufig begleitet von einem gesteigerten Muskeltonus. Im späten Stadium ist bei jedem dritten Betroffenen außerdem ein Parkinson-Syndrom zu finden und bei jedem fünften bis zehnten treten Myoklonien auf. Auch das Risiko für erstmalige Krampfanfälle ist bei Patienten mit AD gegenüber Gesunden sechsfach erhöht. Weiterhin sind sechs Jahre nach Krankheitsbeginn ca. 50 % von Harn- und/ oder Stuhlinkontinenz betroffen. Seltener kommt es zu extrapyramidalen Symptomen im Frühstadium der Demenz, Kleinhirnzeichen, Symptomen des ersten und zweiten Motoneurons und Hirnnervenausfällen.

### Genetische Befunde

Eine signifikante familiäre Häufung findet sich bei 5-10 % aller Patienten mit AD. Dabei ist nur bei einer kleinen Untergruppe innerhalb der Familien mit familiärer Alzheimer Demenz (fAD) die Ursache in einer Mutation auf den Chromosomen 1, 14 oder 21 zu suchen. Bemerkenswert ist, dass sich bei allen drei Chromosomen ein Bezug zum Stoffwechsel des Amyloid-Präkursor-Proteins (APP) nachweisen lässt. So liegt auf Chromosom 21 das Gen des APP, auf den Chromosomen 14 und 1 die Präseniline eins bzw. zwei, welche für transmembranäre Proteine kodieren, deren Funktion mit der Spaltung des APP im

Membranbereich durch die  $\gamma$ -Sekretase zusammenhängt. Liegt eine solche genetische Ursache vor, ist der Erkrankungsbeginn meist präsenil.

Ein genetischer Risikofaktor für die Entwicklung einer AD ist auch das Apolipoprotein E4 (Apo E4). ApoE ist unter anderem für den Transport von Lipiden und Cholesterin verantwortlich. Es wird in der Leber und im Gehirn gebildet und in letzterem vermutlich für die Bereitstellung von Membranlipiden und für Reparaturprozesse benötigt. Das Gen für das ApoE-Protein liegt auf Chromosom 19 und kommt in drei Varianten vor, die sich in ein bis zwei Aminosäuren unterscheiden: Apo E2, das in der Allgemeinbevölkerung am häufigsten vorkommende Apo E3 und Apo E4. 20-30 % der Allgemeinbevölkerung verfügen über mindestens ein Apo E4-Allel, bei AD findet sich dieses in 60-70 % aller Fälle. Ein für Apo E4 homozygoter junger Mensch hat mit 6,4 % ein deutlich höheres Langzeitrisiko eine AD zu entwickeln als ohne diese Ausprägung (2 %). Aus diesen Zahlen wird jedoch auch deutlich, dass das Vorhandensein von Apo E4 keine hinreichende Bedingung ist, um an einer AD zu erkranken und bildet somit auch kein diagnostisches Kriterium.

### Pathogenese

Das primäre pathophysiologische Korrelat der AD ist die Dysfunktion und Abnahme der Synapsen, deren kortikale Dichte um 25-50 % vermindert sein kann. Für den Neuerwerb von Gedächtnisinhalten sind vor allem der entorhinale Kortex und der Hippokampus verantwortlich. Die Speicherung von Gedächtnisinhalten erfolgt vor allem im Bereich des medialen Temporallappens. Die Amygdala hat ihre Bedeutung insbesondere in der Speicherung affektiv getönter kognitiver Prozesse. Die Reduktion der Synapsendichte findet sich vor allem im parietotemporalen, frontalen und entorhinalen Kortex, wodurch es nach derzeitigem Verständnis zur Diskonnektion des Neokortex vom medialen Temporallappen und der hippocampalen Formation kommt, einhergehend mit dem Verlust koordinierter neuronaler Aktivität. Dieses Diskonnektionssyndrom spiegelt sich im EEG als so genannte verminderte „Kohärenz“ wider. Begleitet wird dieser Prozess der Diskonnektion durch erhebliche Störungen verschiedener Neurotransmittersysteme. Insbesondere eine verminderte Aktivität des cholinergen Systems wird als Ursache der kognitiven Defizite von AD-Patienten angesehen. Weiterhin finden sich eine veränderte synaptische Plastizität, ein vermehrter Gehalt der Neurone an Proteinen, die sonst nur während Mitosezyklen gebildet werden, ein verminderter Glucoseverbrauch und eine Aktivierung der Mikroglia in AD-veränderten Gehirnen.

## Histopathologie

Die histopathologischen Befunde bei AD sind sehr umfassend und weisen vielfältige Bezüge zum Phospholipidstoffwechsel auf. Die Hauptveränderungen, diffuse und neuritische Plaques sowie die neurofibrillären Tangles, sind im Folgenden ausführlich dargestellt. Hinzu kommen degenerativ veränderte Neuriten, die - wie auch die neurofibrillären Tangles - durch hyperphosphoryliertes tau-Protein gekennzeichnet sind, Amyloidablagerungen in Gefäßwänden, Schrumpfung und Untergang vor allem der großen Nervenzellen, Abnahme der cholinergen Innervation des Kortex und Involvierung neuroinflammatorischer Mechanismen.

### *Diffuse und neuritische Plaques*

Den Hauptbestandteil der extrazellulären Plaqueablagerungen bei AD bilden die A $\beta$ -Peptide, die durch proteolytische Spaltung mittels  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen aus dem transmembranären Amyloid-Präkursor-Protein entstehen, welches in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen des Gehirns gebildet wird. Dabei kommt es zum einen zur Bildung toxischer extrazellulärer Amyloidfibrillen, die per se noch kein hinreichender pathogenetischer Faktor für die Entstehung einer Demenz sind, und zum anderen zur intraneuronalen Aggregationen der A $\beta$ -Peptide, welche möglicherweise das Zytoskelett stören und zu neuritischer Degeneration führen. Man unterscheidet diffuse und neuritische Plaques. Erstere findet man im Frühstadium der Plaqueentstehung. Sie kommen auch bei gesunden älteren Menschen vor und enthalten im Gegensatz zu den neuritischen Plaques noch keine degenerativ veränderten Neuriten. Die Dichte der neuritischen Plaques hingegen korreliert gut mit dem Auftreten und dem Schweregrad der Demenz. Wie die Umwandlung von diffusen zu neuritischen Plaques abläuft, ist noch ungeklärt.

### *Neurofibrilläre Degeneration („neurofibrillary tangles“)*

Bei den neurofibrillären Tangles handelt es sich um Veränderungen des Zytoskeletts hippokampaler und kortikaler Neurone mit dem Auftreten von paarigen, ineinander verschraubten Filamenten im Zellkörper („tangles“), die vor allem aus Neurofilamenten und verschiedenen Mikrotubuli-assoziierten Proteinen einschließlich einer hyperphosphorylierten Form des so genannten tau-Proteins bestehen. Auch die Ausbreitung der neurofibrillären Degeneration folgt einem einheitlichen Muster mit Beginn im entorhinalen Kortex, gefolgt von Hippokampus und schließlich des Neokortexes, was häufig mit der Entstehung von kognitiven Defiziten verbunden ist. Die Ausbreitung der neurofibrillären Veränderungen schreitet mit zunehmender Schwere der AD fort.

## Therapie

Die Therapie der AD unterteilt sich in die medikamentösen und die nicht-medikamentösen Verfahren. Zu ersteren gehören unspezifisch auf Stoffwechsel und Durchblutung wirkende Medikamente, wie zum Beispiel Ginkgo-Präparate, Piracetam und Vitamin E und Medikamente mit Einfluss auf die Neurotransmission, unter anderem Cholinesterasehemmer, cholinerge Agonisten und Glutamatmodulatoren, Hormone und antiinflammatorische Medikamente. Hinzu kommt die symptomatische Therapie der Verhaltensauffälligkeiten mit Neuroleptika, Antidepressiva und seltener mit Benzodiazepinen. Die nicht-medikamentöse Therapie basiert hauptsächlich auf einer Kombination aus physiotherapeutischen, kognitiv übenden und verhaltenstherapeutischen Elementen mit der Zielstellung der Funktionserhaltung durch Aktivierung plastischer neuronaler Mechanismen (Berger 2004).



### 1.1.3 Vaskuläre Demenz (VD)

#### Epidemiologie

Zerebrale Durchblutungsstörungen gelten als zweithäufigste Ursache demenzieller Syndrome. Auch die Prävalenz der Vaskulären Demenzen steigt mit zunehmenden Alter und wird bei den über 80-Jährigen mit Zahlen zwischen 3 und 16 % angegeben. Die Inzidenz liegt bei 1-7 pro 1000 Personen. Dabei sind Männer in allen Altersklassen häufiger betroffen (Haberl und Schreiber 2005).

#### Pathogenese

Der vaskulären Demenz liegt definitionsgemäß eine ischämisch-hypoxisch bedingte Läsion und Funktionsstörung des Hirngewebes zugrunde. Dieser kausale Zusammenhang ist maßgeblich für die Diagnose. Er kann angenommen werden, wenn eine zeitliche Assoziation zwischen Ischämie, erkennbar an vorübergehenden oder bleibenden neurologischen Ausfällen, und demenzieller Entwicklung vorliegt und wenn der Verlauf der kognitiven Störung Fluktuationen, d. h. stufenförmige Verschlechterungen aufweist.

#### Einteilung und klinisches Erscheinungsbild

Der Begriff Vaskuläre Demenz stellt einen Überbegriff für unterschiedliche Demenzformen dar, deren gemeinsame Basis vaskuläre Gehirnläsionen sind. Sie lassen sich in zwei große Untergruppen unterteilen: die kortikale (Synonym: Multi-Infarkt-Demenz) und die subkortikale (Synonym: Morbus Binswanger) vaskuläre Demenz. Häufig liegen Mischformen vor.

Der kortikalen Form liegen vor allem Perfusionsdefizite aufgrund thrombotischer Verschlüsse bzw. arterio-arterieller oder kardiogener Embolien der hirnversorgenden Gefäße zugrunde. Es kommt zur Entstehung von Infarkten, die die Hirnrinde mit einbeziehen und aus deren Lokalisation sich das klinische Bild ergibt. Neben den fokalen neurologischen Defiziten treten Gedächtnisstörungen, Aphasie, Agnosie, Dyspraxie, Dysgraphie, Dyslexie sowie Störungen der Aufmerksamkeit und des Urteilsvermögens auf (Wolf und Gertz 2004).

In Abgrenzung hierzu ist die subkortikale vaskuläre Demenz auf eine vorwiegend hypertensiv bedingte Arteriolosklerose zurückzuführen. Es kommt zur Entstehung von Lakunen, kleinen Infarkten (Durchmesser 2-15 mm) im Bereich von Stammganglien, Thalamus und tiefem Marklager. Direkt durch diese Läsionen bzw. durch die Unterbrechung funktioneller Regelkreise zwischen Frontalhirn, Basalganglien und Thalamus kommt es charakteristischer Weise zu einer Störung der Exekutivfunktionen und – unter Umständen nur leichten –

mnestischen Defiziten, begleitet von Persönlichkeitsveränderungen, Affektlabilität und psychomotorischer Verlangsamung. Akute zerebrovaskuläre Ereignisse sind in der Regel nicht zu beobachten (Pohjasvaara et al. 2003). Zu den subkortikalen Demenzen können im weiteren Sinn auch die Demenzen bei Morbus Parkinson, Chorea Huntington und Morbus Wilson gezählt werden (Reichmann und Sommer 2001).

### Therapie

Die bedeutendste therapeutische Intervention liegt zur Zeit in der Prävention ischämischer Ereignisse durch die Verminderung vaskulärer Risikofaktoren. Am effektivsten scheint sich dabei die Behandlung der arteriellen Hypertonie auszuwirken. Durch die Senkung des Blutdrucks konnten Forette et al. eine 50-prozentige Risikominderung bezüglich der Entwicklung einer Demenz feststellen (Forette et al. 2002). Positive Effekte wurden außerdem für den Cholinesterasehemmer Galantamin und den Glutamatmodulator Memantine publiziert (Erkinjuntti et al. 2002, Orgogozo et al. 2002).

#### 1.1.4 Demenz vom Mischtyp Alzheimer- und Vaskuläre Demenz (AVD)

Zu dieser Gruppe zählen demenzielle Syndrome, die unter klinisch-pathologischen Gesichtspunkten neben Symptomen einer Alzheimer Demenz auch Symptome einer Vaskulären Demenz aufweisen. Besonders im hohen Alter, in welchem die Prävalenzen für beide Erkrankungen zunehmen, ist von einer hohen Komorbidität auszugehen. Neben dem steigenden Alter ist für beide Formen der Genotyp 4 des ApoEs als Risikofaktor anerkannt. Häufig kommt es vermutlich erst durch die Summation vaskulärer und Alzheimer bedingter Neuropathologien zur klinischen Manifestation einer Demenz. Außerdem scheinen Personen mit AD ein erhöhtes Schlaganfallrisiko zu haben und umgekehrt konnte festgestellt werden, dass sich das Risiko an AD zu erkranken nach unbemerkten Hirninfarkten verdoppelt (Pasquier und Leys 1997, Pasquier et al. 1998, Vermeer et al. 2003). Letzteres könnte darin begründet liegen, dass Ischämien zu einer Erhöhung der APP-Konzentration beitragen, wodurch perivaskuläre Ablagerungen von Amyloid die Hirnperfusion und damit die zerebrale Mikrozirkulation vermindern (Hüll und Schmidtke 2004). Bei einer Mehrheit der Patienten mit AD sind Veränderungen einer Amyloidangiopathie nachzuweisen, wobei das Amyloid der Gefäßwände dem der Alzheimer Plaques entspricht (Ellis et al. 1996).

### 1.1.5 Weitere untersuchte Demenzformen

Die nachfolgenden Demenzformen spielen in der vorliegenden Studie nur eine untergeordnete Rolle. Da sie aber ebenfalls pathophysiologische Bezüge zum Phospholipidstoffwechsel aufweisen, sollen sie im Folgenden kurz erläutert werden.

#### Frontotemporale Demenz (FTD)

Die frontotemporalen Demenzen zeichnen sich durch einen schleichenden Beginn und kontinuierliche Progredienz mit im Vordergrund stehenden Wesensveränderungen und Beeinträchtigungen des Sprachvermögens aus. Charakteristisch sind eine anfänglich gut erhaltene Gedächtnisleistung und Orientierungsfähigkeit. Neuropathologisch fallen Atrophien des Frontal- und Temporallappens, sowie seltener der Basalganglien und motorischen Vorderhornzellen auf. Histologisch stehen Neuronenverlust und Gliose im Vordergrund (Ibach 2005).

#### Lewy-Körper-Demenz (LKD)

Die Abgrenzung der LKD von der AD und der Demenz bei M. Parkinson (DP) gestaltet sich sehr schwierig. Differentialdiagnostisch sind insbesondere die häufig fluktuierenden kognitiven Defizite, frühzeitig einsetzende extrapyramidalmotorische Symptome vom hypokinetisch-rigiden Typ mit einer Neigung zu häufigen Stürzen und Synkopen, visuelle oder akustische Halluzinationen sowie eine häufige Neuroleptikaüberempfindlichkeit von Bedeutung. Neuropathologisch findet man eine Häufung von Lewy-Körperchen in den pigmentierten Kerngebieten des Hirnstammes sowie in Pyramidenzellen von Cingulum, Amygdala, Hippokampus sowie entorhinalen und Neokortex (Wallesch und Förstl 2005).

#### Demenz bei Normaldruckhydrozephalus (NPH)

Der Normaldruckhydrozephalus ist durch die typischen Trias aus Demenz, Gangstörung und später auftretender Inkontinenz, verbunden mit einer Besserung der Symptomatik durch den Liquorablassversuch charakterisiert. Neben einer Störung des Gedächtnisses besteht häufig eine auffallende Verlangsamung mit Beeinträchtigung von Antrieb, Aufmerksamkeit, Urteils- und Abstraktionsvermögen. Der Verlauf ist mit starken Fluktuationen innerhalb kurzer Zeiträume über längere Zeit langsam progredient. Morphologisch fallen eine Aufweitung des dritten und der Seitenventrikel im CT auf (Förstl und Hüll 2004).

### Korsakow-Syndrom (Ko-S)

Das Ko-S ist eine in der Regel chronisch verlaufende alkoholbedingte mnestisches Störung mit einer Letalität von 15-20 %. Es beginnt häufig in zeitlicher Assoziation mit einer Wernicke-Enzephalopathie, seltener mit Verwirrheitszuständen anderer Genese. Störungen des Alt- und Neugedächtnisses (mit Konfabulationen) sowie der Konzentrations- und Orientierungsfähigkeit bilden die Leitsymptome. Begleitend ist häufig eine Polyneuropathie zu verzeichnen (Mann et al. 2004).

### Demenz bei Morbus Parkinson (DP)

Patienten mit einem idiopathischen Morbus Parkinson entwickeln zu ca. 30 % eine Demenz. Ein weiteres Drittel leidet unter leichteren kognitiven Störungen, die sich unter Levodopa bessern können. Eine verminderte Sprachproduktion kann das erste Zeichen einer demenziellen Entwicklung sein. Später kommt es zur charakteristischen Bradyphrenie. Wahn und Halluzinationen sowie eine depressive Symptomatik können hinzutreten (Förstl und Hüll 2004).

### Creutzfeld-Jacob-Demenz (CJD)

Bei der CJD handelt es sich um eine rasch fortschreitende Demenz (Monate bis ein oder zwei Jahre), die von ausgeprägten neurologischen Störungen des pyramidalen und extra-pyramidalen Systems, häufig mit Myoklonus, begleitet ist. Im EEG zeigt sich regelmäßig ein charakteristisches Bild mit triphasischen Wellen, welches neben dem Nachweis krankheitsspezifischer Proteine im Liquor hilfreich zur Diagnosestellung beiträgt (Förstl und Hüll 2004).

### Fatale-Familiäre-Insomnie (FFI)

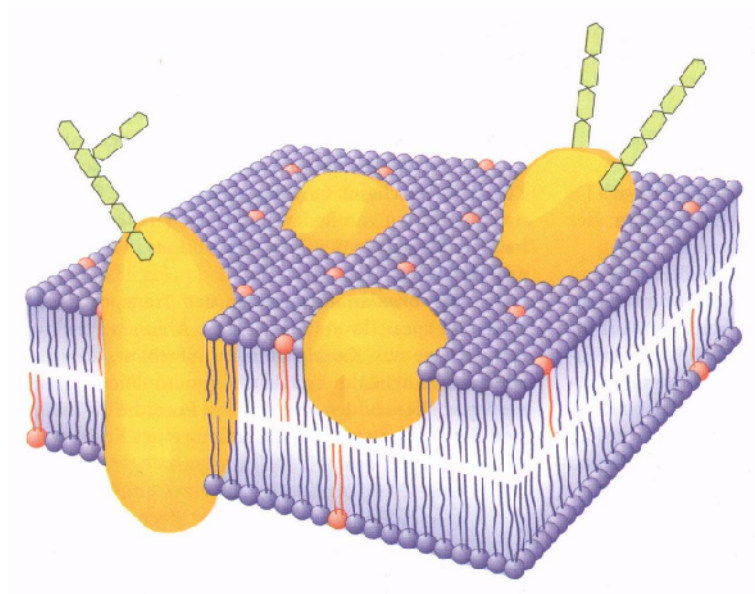
Die FFI gehört zu den autosomal dominant vererbten Prionkrankheiten. Neben der demenziellen Symptomatik zeigen sich in der Regel Insomnie, Ataxie und Myoklonien. Die FFI ist sehr selten und verläuft mit rascher Progredienz tödlich (Förstl und Hüll 2004).

## 1.2 Neuronale Membranen, Phospholipide und PLA<sub>2</sub> im Stoffwechselgeschehen des Zentralen Nervensystems

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität bei demenziellen Erkrankungen. Eine wichtige Grundlage zur möglichen Bedeutung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität bei psychiatrischen Erkrankungen bildet die von Horrobin et al. zunächst auf Schizophrenien angewandte „Membran-Phospholipid-Hypothese“, die davon ausgeht, dass eine regelrechte Funktion aller Transmitter- und Rezeptorsysteme einen intakten Auf- und Abbau von Membranphospholipiden voraussetzt. Phospholipide im Zentralen Nervensystem sind reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, deren Metabolismus einer strengen Kontrolle durch die Phospholipase A<sub>2</sub> und die Acyltransferase unterliegt. Sind diese Enzyme in ihrer Aktivität verändert, ist eine gestörte Regulation des Metabolismus der Phospholipide anzunehmen, was sich insbesondere in einer veränderten Struktur und Fluidität neuronaler Membranen sowie in der Beeinträchtigung intrazellulärer Signalwege und Funktionen von Neurotransmittern und Ionenkanälen zeigen würde (Horrobin et al. 1994, Horrobin 1998). Nach den allgemeinen klinischen und pathophysiologischen Erläuterungen werden nachfolgend Aufbau, Funktion und Regulation der Phospholipide und der PLA<sub>2</sub> dargestellt. Dabei wird ein Schwerpunkt auf die mögliche Bedeutung der Phospholipide und der PLA<sub>2</sub> für demenzielle Erkrankungen gesetzt, um die der Studie zugrunde liegende Hypothese argumentativ zu unterlegen.

### 1.2.1 Aufbau neuronaler Membranen

Zelluläre Membranen bestehen aus einer Doppelschicht asymmetrisch angeordneter, amphiphiler Lipide mit integrierten Membranproteinen, siehe Abbildung 2.

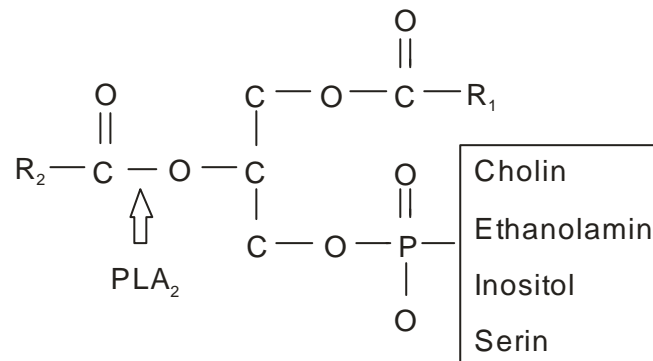


**Abb. 2** Membranmodell von Singer und Nicolson (Löffler und Petrides 2003)

Die Membranproteine sind hauptsächlich für Stofftransport, Signaltransduktion, Zell-Zell-Kontakte und Identifikation der Zelle als „Selbst“ zuständig (Löffler und Petrides 2003).

Der Lipiddoppelschicht liegen drei große Kategorien von Lipiden zu Grunde: Phospholipide, Sphingolipide und Cholesterin. Von diesen drei bilden die Phospholipide das so genannte „Rückgrad“ der neuronalen Membran (Farooqui et al. 2004). Ihr Grundgerüst besteht aus dem dreiwertigen Alkohol Glycerol, welcher an den ersten beiden Kohlenstoffatomen (sn-1 und sn-2) mit verschiedenen langkettigen Fettsäuren verestert ist. An das dritte C-Atom (sn-3) sind über eine Phosphodiesterbindung kurzkettige polare Verbindungen (u. a. Cholin, Ethanolamin, Inositol oder Serin) gekoppelt. Diese so genannte Kopfgruppe bildet den geladenen hydrophilen Teil der Verbindung. Der ungeladene hydrophobe Teil besteht aus der Schwanzgruppe mit den beiden langkettigen Acylresten. Durch diese Ladungsunterschiede innerhalb des Moleküls kommt es zur Ausbildung der typischen Lipiddoppelschicht im wässrigen Milieu, wie sie in Abbildung 2 zur Darstellung kommt.

Die genaue Struktur eines einzelnen Phospholipids ist Abbildung 3 zu entnehmen.



**Abb. 3** Phospholipid und Angriffspunkt der PLA<sub>2</sub> modifiziert nach Farooqui et al. 2000

R<sub>1/2</sub> = Rest 1/ 2

Der Acylrest am sn-1 wird in neuronalen Membranen in der Regel von gesättigten Fettsäuren gebildet, deren Funktion hauptsächlich in der Vermittlung der Neuroplastizität liegt (Wakabayashi et al. 1994). Am sn-2 ist meist eine mehrfach ungesättigte Fettsäure (PUFA) gebunden, welche drei bis sechs Doppelbindungen enthält. Diese wird auch als essentielle Fettsäure bezeichnet, da sie von Säugetieren nicht de novo synthetisiert werden kann, sondern mit der Nahrung zugeführt oder von der Leber aus den Ausgangssubstanzen Linolsäure oder Alpha-Linolensäure synthetisiert werden muss. Für das Zentrale Nervensystem am bedeutsamsten sind Arachidon-, Docosahexaen-, Dihomogammalinolen- und Eicosapentaensäure. Sie machen 15-30 % des Trockengewichtes des neuronalen und retinalen Gewebes aus, 80-90 % davon sind allein der Arachidon- und der Docosahexaensäure zuzuschreiben. Kommt es zu einem Mangel an PUFAs, werden sie durch minderwertigere Fettsäuren ersetzt, wodurch zahlreiche Funktionen der Phospholipide bzw. der essentiellen Fettsäuren selbst nicht mehr optimal gewährleistet werden können (Horrobin 1998, Farooqui et al. 2000a). Die Hydrolyse der sn-2 Esterbindung wird durch die PLA<sub>2</sub> gewährleistet (Six und Dennis 2000).



### 1.2.2 Gruppierung der PLA<sub>2</sub>

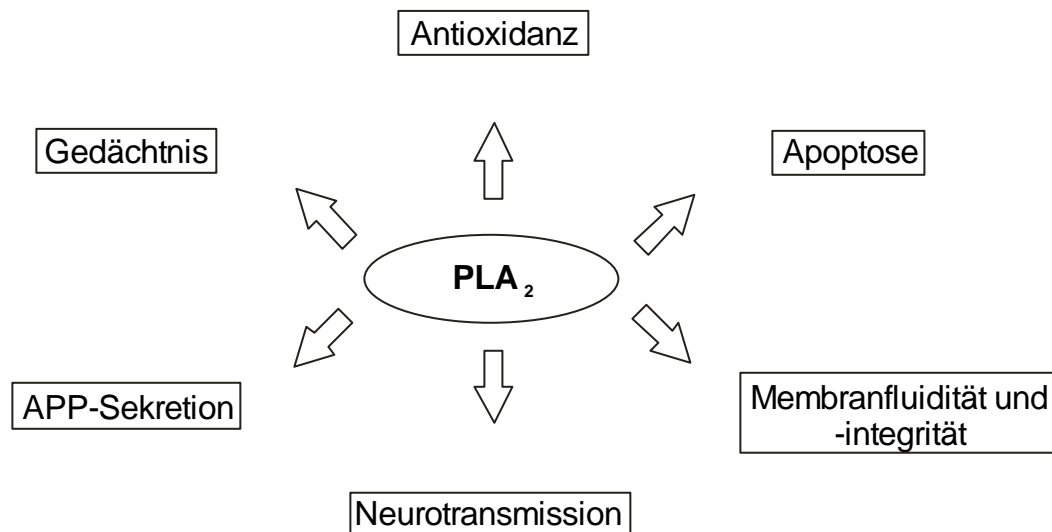
Die Gruppe der Phospholipase A<sub>2</sub>-Enzyme bildet eine ständig wachsende Familie, welche auch als so genannte „superfamily“ bezeichnet wird. In der Literatur existieren zwei Klassifikationsschemata. Die dyadische Unterteilung der PLA<sub>2</sub>-Enzyme basiert maßgeblich auf dem Erfordernis von Kalzium für ihre enzymatische Aktivität. Es wird zwischen den kalziumabhängigen und den kalziumunabhängigen Varianten des Enzyms unterschieden. Zur ersteren gehört die sekretorische PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>), welche Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen im millimolaren Bereich benötigt und die cytosolische PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>), der eine Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im mikromolaren Bereich genügt. Ihnen gegenüber steht die Ca<sup>2+</sup>-unabhängige PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>), welche den Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit bildet. Die sPLA<sub>2</sub> ist in cytosolischer Granula gespeichert. Auf bestimmte Reize wird sie nach extrazellulär abgegeben. Die cPLA<sub>2</sub> und die iPLA<sub>2</sub> sind intrazelluläre Enzyme, wobei ersteres grundsätzlich im Cytosol lokalisiert ist und in die Membran transloziert wird. Die iPLA<sub>2</sub> hingegen ist sowohl im Cytosol als auch in Membranteilen zu finden.

Die molekulargenetische Klassifikation erweitert die dyadische. Bis dato sind im Säugetier-System 19 verschiedene Isoformen molekulargenetisch identifiziert worden. Die iPLA<sub>2</sub>, deren Aktivität in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, wird der Gruppe VI zugeordnet (Sun et al. 2004). Säulenchromatographisch wurden zwei Fraktionen der iPLA<sub>2</sub> gefunden, eine 39 kDa und eine 110 kDa Fraktion (Farooqui et al. 1997b). Die iPLA<sub>2</sub> enthält eine Lipase-Sequenz (GXSTG) und ein mutmaßliches ATP-Bindungs-Motiv. Das menschliche iPLA<sub>2</sub>-VI A-Gen kodiert für fünf Splicevarianten mit 7-8 Ankyrinrepeats am N-Ende, der iPLA<sub>2</sub>-VI B fehlen diese Ankyrinrepeats. Sie enthält ein Signalmotiv für die Peroxisomen-lokalisierung am C-Ende (Akiba und Sato 2004). Die Bedeutung der iPLA<sub>2</sub> für zentrale Prozesse scheint sehr umfassend zu sein. Eine Studie von Yang et al. zeigt, dass über 70 % der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Gehirnen von Ratten auf die iPLA<sub>2</sub> zurückzuführen sind (Yang et al. 1999).

Aufgrund der höheren Praktikabilität wird in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die dyadische Klassifikation verwandt und von einer „iPLA<sub>2</sub>“ gesprochen.

### 1.2.3 Die funktionelle Bedeutung der Phospholipide und der PLA<sub>2</sub> im ZNS

Die Funktionen der Phospholipide und der PLA<sub>2</sub> sind von umfassendem Charakter und häufig eng miteinander verwoben. Einen Überblick über wichtige und für die vorliegende Untersuchung bedeutende Aufgaben gibt Abbildung 4.



**Abb. 4** Funktionen der Phospholipase A<sub>2</sub>

APP = Amyloid-Präkursor-Protein

#### Membranfluidität und Membranintegrität

Eine der bedeutendsten Aufgaben der hier untersuchten Phospholipase A<sub>2</sub> ist unter physiologischen Bedingungen der Erhalt der Membranfluidität. Diese ergibt sich durch den Umsatz von Phospholipiden und Umbauprozesse an den Membranen. Der Acylierungs-/Deacylierungszyklus (vgl. Abbildung 7), in welchen die PLA<sub>2</sub> wesentlich involviert ist, bildet außerdem durch die Kontrolle der Balance zwischen freien und veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren einen der wichtigsten Mechanismen für den Erhalt der Integrität neuronaler Membranen (Farooqui et al. 2004). Die daraus entstehende typische Komposition der Glycerophospholipide mit ihrer variablen Fettsäurezusammensetzung gibt jeder Membran eigene charakteristische Eigenschaften (Crews 1982, Yeagle 1989). Die iPLA<sub>2</sub> übernimmt innerhalb dieser struktur- und funktionsgebenden Prozesse als so genanntes housekeeping-Enzym entscheidende Funktionen (Akiba und Sato 2004).

In einer Studie von Schaeffer et al. fand sich eine Reduzierung der Membranfluidität an hippocampalem Gewebe von Ratten, in welches der c- und iPLA<sub>2</sub>-Inhibitor PACOCF<sub>3</sub> in vivo injiziert worden war. Die Arbeitsgruppe diskutierte dieses Ergebnis im Zusammenhang mit

Gedächtnisdefiziten bei eingeschränkter Membranfluidität (Schaeffer et al. 2005). Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass eine reduzierte Membranfluidität an hippocampalen Membranen von Ratten Gedächtnisprozesse behindert, wohingegen eine erhöhte Fluidität diese verbessert (Hong 1995, Clarke et al. 1999, Müller et al. 1997, Scheuer et al. 1999). Letzteres wird vermutlich über eine erhöhte Dichte von NMDA- und Muscarin-Rezeptoren vermittelt, welche beide an Gedächtnisprozessen beteiligt sind (Scheuer et al. 1999, Muccioli et al. 1996, Izquierdo und Medina 1997). Weiterhin konnte ein Zuwachs der Membranfluidität im Bereich der Zellkernmembran im Zusammenhang mit einem erhöhten nucleozytoplasmatischen RNA-Transport gezeigt werden (Tomassoni et al. 1999). Auch die mRNA vermittelte Genexpression ist von grundlegender Bedeutung für die Gedächtnisbildung (Igaz et al. 2002). Einen direkten Anhaltspunkt für reduzierte Membranfluidität bei Patienten mit AD zeigten Eckert et al. an hippocampalen und Mecocci et al. an mitochondrialen Membranen in post mortem Studien (Eckert et al. 2000, Mecocci et al. 1997).

Im Gegensatz dazu fanden sich bei Untersuchungen der Membranfluiditäten peripherer Zellen (Thrombozyten und Leukozyten) bei Patienten mit AD in mehreren Studien erhöhte Membranfluiditäten (Zubenko et al. 1987, Hajimohammadreza et al. 1990, Kukull et al. 1992, Kalman et al. 1994, Scott et al. 1994). Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Zubenko et al. zeigten dies auch in Hippokampusregionen von AD-Patienten (Zubenko 1986). Keine Veränderungen der Membranfluidität bei der Untersuchung vier verschiedener Hirnareale von AD-Patienten und Kontrollpersonen fanden Hajimohammadreza und Brammer (Hajimohammadreza und Brammer 1990).

Trotz der unübersehbaren Heterogenität in den Befunden zur Membranpathologie bei AD scheint sich als Haupttendenz der ZNS nahen Untersuchungen (z.B. post mortem) eine mit Gedächtnisstörungen verbundene Verminderung der Membranfluidität anzudeuten. Biochemisches Korrelat hierfür könnte eine gestörte iPLA<sub>2</sub>-Funktion sein, am ehesten eine verminderte Aktivität.

### Neurotransmission

Die meisten Neurotransmitter werden im zentralen Nervensystem aus synaptischen Vesikeln durch Exozytose freigesetzt (Damer und Creutz 1994). Zwar sind die genauen Mechanismen noch immer unbekannt, aber es wird vermutet, dass sowohl der PLA<sub>2</sub> als auch der AA bedeutende Rollen in der Neuroexozytose zukommen. Ray et al. konnten an nerve growth factor-differenzierten PC 12 Zellen zeigen, dass die PLA<sub>2</sub> und die AA in zytoskelettale Organisationsprozesse involviert sind, die zu Vesikelfusion und Exozytose führen (Ray et al.

1999). Und auch Bloch-Shilderman et al. fanden, dass eine Aktivierung von cPLA<sub>2</sub> und auch iPLA<sub>2</sub> über die Generierung von AA und Eicosanoiden in PC 12 Zellen zu einer Stimulierung der Vesikelfusion und Neurotransmitterfreisetzung führt (Bloch-Shilderman et al. 2002). Ergänzend wirkt sich aus, dass die durch die PLA<sub>2</sub> freigesetzte AA die Insertion der Proteinkinase C an der Membran fördert (Lester und Bramham 1993). Diese Translokation und Aktivierung der Proteinkinase C hängt ebenfalls mit einer verbesserten Neurotransmitterfreisetzung zusammen. Auch die aus der AA synthetisierten Prostaglandine sollen an der Modulation der Neurosekretion im zerebralen Kortex beteiligt sein (Hedqvist 1978).

Hinzu kommt die Bedeutung der PLA<sub>2</sub> für die Bereitstellung von Cholin in cholinergen Neuronen. Durch die Spaltung von Phosphatidylcholin durch die PLA<sub>2</sub> kommt es zur Freisetzung von Cholin, welches den wichtigsten Ausgangsstoff für die Synthese von Acetylcholin bildet (Blusztajn et al. 1987, Farooqui et al. 1992). Mit Hilfe der Cholinacetyltransferase werden Cholin und Acetyl-CoA zu Acetylcholin synthetisiert. Eine post mortem Untersuchung von Kanfer und McCartney zeigte, dass die Hydrolyse von Phosphatidylcholin in temporalen Hirnregionen von AD-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen deutlich vermindert ist. Die Veränderungen ließen sich im occipitalen Kortex interessanterweise nicht nachweisen (Kanfer und McCartney 1986).

Zusammengenommen kommen also sowohl Defizite in der Acetylcholinbereitstellung als auch in dessen Freigabe als potentielle Folgen gestörter iPLA<sub>2</sub>-Funktion in Frage.

### APP-Sekretion

Neuritische Plaques bestehen hauptsächlich aus aggregiertem Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ), welches durch die proteolytische Abspaltung einer Gruppe von Aminosäuren aus der Sequenz des APPs (APP 597-639) entsteht. Physiologischerweise wird das membrangebundene APP bevorzugt in der Mitte der A $\beta$ -Region durch  $\alpha$ -Sekretasen gespalten und sezerniert, was der Entstehung von A $\beta$  entgegenwirkt. Ein anderer Teil des APPs wird jedoch in intrazelluläre Kompartimente eingeschlossen, in deren saurem Milieu A $\beta$  40 und 42 mittels  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase erzeugt und anschließend von den Zellen sezerniert werden können (Haass und Selkoe 1993, Schlegel 2005). Die aggregierte Form des A $\beta$  Peptids, besonders A $\beta$  42, wird für zytotoxische Effekte und einen möglicherweise resultierenden Zelltod in der Pathologie der AD verantwortlich gemacht (Butterfield 2002, Butterfield et al. 2002a). Außerdem konnte festgestellt werden, dass A $\beta$  die Freisetzung von Cytokinen und Stickstoffoxid aus Astrozyten stimuliert, was die erhöhten oxidativen und inflammatorischen Prozesse in der AD-Pathogenese erklären könnte, welche wiederum über einen erhöhten Kalziumeinstrom zur

Aktivierung der Apoptose führen (Akama und Van Eldik 2000, Mattson 2002, Perry et al. 2002).

Die Freisetzung des APPs wird neben verschiedenen Signaltransduktionsprozessen auch durch die PLA<sub>2</sub> getriggert. Emmerling et al. konnten zeigen, dass eine Hemmung der PLA<sub>2</sub> die carbachol-induzierte Sekretion von membrangebundenem APP reduziert, wohingegen eine Aktivierung des Enzyms die APP-Freisetzung erhöhte (Emmerling et al. 1993). APP selbst übernimmt in seiner membrangebundenen Form die Vermittlung von Zell-Zell- oder Zell-Substrat-Interaktionen. Sezerniertes APP nimmt Einfluss auf das Auswachsen von Neuriten (Shivers et al. 1988, Milward et al. 1992). Weiterhin werden dem APP neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben. Mattson et al. wiesen nach, dass humane Neuronenkulturen durch APP vor der toxischen Wirkung einer Glutamatbehandlung geschützt wurden, wohingegen A $\beta$  zu einer Verstärkung der toxischen Wirkung führte (Mattson et al. 1993).

#### Langzeitpotenzierung (LTP) und Gedächtnis

LTP ist definiert als eine dauerhafte Erhöhung der synaptischen Wirksamkeit, welche kurzen hochfrequenten Stimulationen im Hippokampus folgt. Diese Form synaptischer Plastizität charakterisiert eine der fundamentalsten molekularen Mechanismen für Lern- und Gedächtnisvorgänge (Bliss und Collingridge 1993). Ein Weg der Induktion der LTP liegt in der Freisetzung von Arachidonsäure. Sie selbst bzw. ihre Metabolite konnten in einigen Studien als potentielle postsynaptische Messenger identifiziert werden, die über den Zwischenschritt der Aktivierung der Proteinkinase C die Transmitterfreisetzung während der LTP modifizieren (Bramham et al. 1994, Drapeau et al. 1990). So konnten Williams et al. eine Erleichterung der durch hochfrequente Stimulation ausgelösten LTP durch von außen zugeführte AA erreichen (Williams et al. 1989). Nishizaki et al. sehen die AA ebenfalls als einen signifikanten Faktor für die Expression der LTP (Nishizaki et al. 1999). Zusätzlich postulierten Fujita et al. eine entscheidende Rolle der Docosahexaensäure-Freisetzung (Fujita et al. 2001). Übereinstimmung scheint über das die Freisetzung der PUFAs katalysierende Enzym zu herrschen, verschiedene Studien deuten auf eine entscheidende Rolle der iPLA<sub>2</sub> hin (Fujita et al. 2001, Wolf et al. 1995).

Neben diesen Studien, die sich speziell mit der LTP beschäftigen, gibt es auch direkte Untersuchungen zu mnestischen Funktionen im Zusammenhang mit der PLA<sub>2</sub>-Aktivität. So zeigen Untersuchungen an jungen Küken von Holscher und Rose, dass bilaterale intrazerebrale Injektionen verschiedener PLA<sub>2</sub>-Inhibitoren zu anhaltenden Störungen mnestischer Funktionen führen (Holscher und Rose 1994). Die direkte Behandlung von

Mäusen mit dem potenten und iPLA<sub>2</sub>-selektiven Inhibitor Bromoenol Lacton (BEL) machte sich in einer eindeutigen Einschränkung des räumlichen Gedächtnisses bemerkbar (Fujita et al. 2000).

Zusammengenommen sprechen sowohl die Befunde der gestörten Membranfluidität als auch die Störungen in der LTP, beides an iPLA<sub>2</sub>-Funktion und Arachidonsäure gekoppelte Abläufe, für die Behinderung von Lern- und Gedächtnisfunktionen.

### Oxidativer Stress

Neuronale Membranen sind aufgrund ihres hohen durch Glucose gesteuerten metabolischen Umsatzes, ihres geringen Pegels an Antioxidantien und ihres großen Gehaltes an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, aus welchen sehr leicht reaktive Radikale entstehen können, besonders empfindlich gegenüber oxidativem Stress (Farooqui et al. 2004). Hinzu kommt die Reichhaltigkeit des Gehirns an Eisen, verbunden mit keiner bzw. einer nur sehr geringen Eisenbindungskapazität des umgebenden Liquors. In Anwesenheit von Eisen können instabile peroxidierte Lipide weiter zu Radikalen zerfallen, was eine Kettenreaktion auslösen kann. Freie Radikale entstehen außerdem in geringen Mengen während der normalen zellulären Stoffwechselprozesse. Ein weiterer Grund für die große Empfindlichkeit der Neurone gegenüber oxidativem Stress ist ihr hoher Konsum an Sauerstoff (Halliwell 1994, Farooqui et al. 2000a).

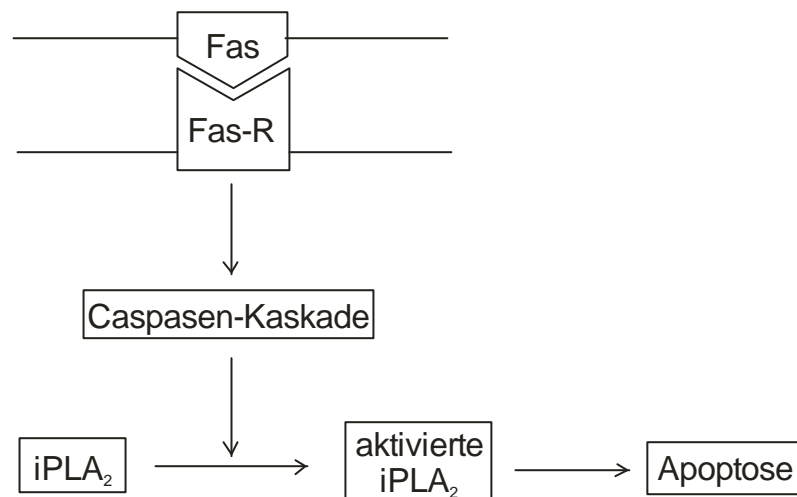
Der durch Lipidperoxidation verursachte Schaden an neuronalen Membranen hat weitreichende Folgen. Es kommt zur Beeinflussung physikochemischer Merkmale der Membran, die die Orientierung der verschiedenen Domänen für die Interaktionen der Membranproteine (Rezeptoren, Enzyme und Ionenkanäle) verändern. Veränderungen in der Zahl der Rezeptoren und ihrer Affinität für Neurotransmitter und Medikamente treten hinzu. Des Weiteren sind peroxidierte Lipide in der Lage, Aldehyde zu generieren, welche wiederum Vernetzungen von Enzymen und Proteinen hervorrufen können und sie dadurch inaktivieren. Auch eine Hemmung der Ionenpumpen und damit verbundene Veränderungen des Ionengleichgewichts können durch eine gesteigerte Lipidperoxidation hervorgerufen werden. Weiterhin ist es möglich, dass die verstärkte Anwesenheit peroxidierter Glycerophospholipide zu einer defekten Membrandichtung führt, was zu einem erhöhtem Ca<sup>2+</sup>-Influx mit den Folgen von Apoptose und Nekrose führen kann (Farooqui et al. 2000b).

Die PLA<sub>2</sub> übernimmt durch die Hydrolyse der peroxidierten Glycerophospholipide eine Schutzfunktion für die Membranen. Dieser Vorgang wird dadurch unterstützt, dass die sn-2 Bindung der Phospholipide der PLA<sub>2</sub> bei defekter Membrandichtung leichter zugänglich ist. Die PLA<sub>2</sub> entfernt damit die peroxidierten membrandestabilisierenden Fettsäuren und schafft

so die Möglichkeit, die von den geschädigten Fettsäuren befreiten Lysophospholipide zu reacylieren und in die Membran zu reintegrieren (McLean et al. 1993, Farooqui et al. 2000a, Salgo et al. 1993). Unterstützt wird diese Hypothese durch verschiedene Studien, die eine signifikant gesteigerte AA-Freisetzung und eine erhöhte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Zusammenhang mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachwiesen (Birbes et al. 2000, Martinez und Moreno 2001, Xu et al. 2003). Die Phospholipase trägt hier dazu bei, die physiologischerweise vorhandenen physikochemischen Merkmale der neuronalen Membran wieder herzustellen.

### Apoptose

Im Verlauf der Apoptose kommt es zu einem umfassenden Verlust der asymmetrischen Verteilung von Glycerophospholipiden in Plasmamembranen (Williamson und Schlegel 2002). Die Phospholipide des äußeren Blattes der Zellmembran enthalten physiologischerweise mehr gesättigte Fettsäuren, mit einer festeren Dichtung der Membran einhergehend. Dahingegen sind die Phospholipide des inneren Blattes reicher an ungesättigten Fettsäuren, resultierend in einer lockereren Dichtung. Die Unterbrechung dieser biologisch notwendigen Phospholipidasymmetrie während der Apoptose führt zu einem Verlust der festen Abdichtung im äußeren Blatt. Diese Veränderung geht mit der Möglichkeit eines in der Regel nur leicht verstärkten, kurz dauernden Kalziumeinstroms einher, welcher durch die Aktivierung von Caspasen und kalziumabhängiger Phospholipase A<sub>2</sub> zu neuronalen Degenerationsprozessen führen kann. Dabei kommt es in Abhängigkeit von der Stärke und Dauer des Kalziumeinstroms zunächst zu apoptotischen Vorgängen und ab einem bestimmten Grad der Überladung der Zelle mit Kalzium zur Nekrose (Farooqui et al. 2004). Die Vermittlung der Apoptose erfolgt unter anderem über die Membranrezeptoren der Zelle. Während die cPLA<sub>2</sub> in die TNF $\alpha$ -induzierten Apoptosevorgänge involviert ist, spielt die iPLA<sub>2</sub> bei der durch Fas ausgelösten Apoptose die entscheidende Rolle. Dabei kommt es durch die Aktivierung des Fas-Rezeptors (Fas-R) neuronaler Membranen direkt über die Caspasen-Kaskade zur Aktivierung der iPLA<sub>2</sub>, siehe Abbildung 5 (Atsumi et al. 1998, Atsumi et al. 2000).



**Abb. 5** Fas-induzierte Apoptose modifiziert nach Farooqui et al. 2004

Fas-R = Fas-Rezeptor

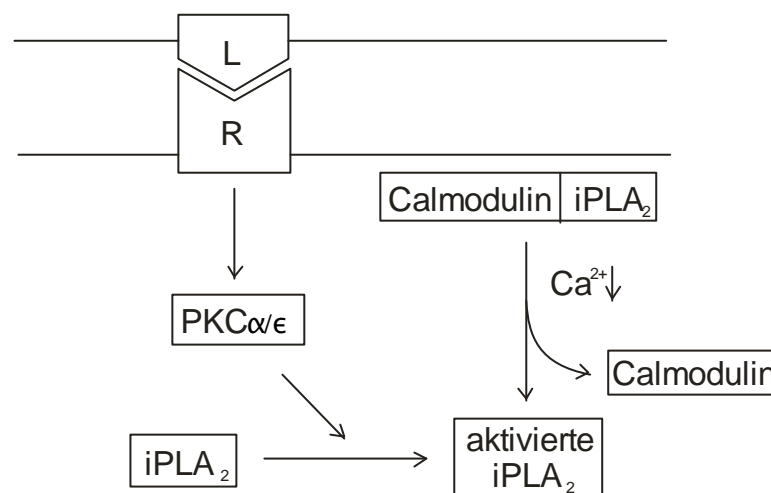
Auslöser für die Apoptose kann ein überschießendes Angebot freier mehrfach ungesättigter Fettsäuren sein. Normalerweise werden Arachidonsäure und Lysophospholipide in der Zelle durch energieabhängige Reaktionen recycelt, so dass der normale Phospholipidgehalt der neuronalen Membran erhalten bleibt und intrazelluläre Konzentrationen an freien Arachidonsäuren und Lysophospholipiden auf niedrigem Niveau gehalten werden. Bei unkontrollierter Freisetzung von AA bzw. durch eingeschränkte Membranreparaturprozesse (z.B. durch eine verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität) kann es jedoch zu einem starken Anstieg dieser Metabolite kommen (Piomelli 1993). Erhöhte Konzentrationen an AA führen z.B. neben ihrer proapoptotischen Wirkung zur gesteigerten Synthese und Akkumulation von Eicosanoiden und zur Entstehung von 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE), einem peroxidierten Produkt der AA (Camandola et al. 2000). Die Wirkung der Peroxide und die durch sie ausgelösten apoptotischen Vorgänge sind bereits in dem vorangegangenen Kapitel näher erläutert worden.



### 1.2.4 Regulation der PLA<sub>2</sub>

Phospholipase A<sub>2</sub>-Enzyme unterliegen einer komplexen Regulation. Es spielen vor allem rezeptorvermittelte Prozesse durch Cytokine (TNF $\alpha$ , IL 1 $\alpha$ ), Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter und Hormone eine Rolle. Die Phospholipase A<sub>2</sub> ist unter anderem über G-Proteine an Muscarin-, Dopamin-, NMDA- und AMPA-Rezeptoren gekoppelt. Über diese kommt es durch Veränderungen der Kalziumkonzentration zur Aktivierung des Enzyms. Dieses wird durch den Einfluss der Kalziumkonzentration auf die Translokation der Phospholipasen in die Membranen der Zelle und die Kinasen vermittelten Phosphorylierungen erreicht (Farooqui et al. 2004).

Die Regulierung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität erfolgt hauptsächlich über den Gehalt von Ca<sup>2+</sup> in den intrazellulären Kalziumspeichern bzw. durch das kalziumabhängige Protein Calmodulin. Dabei geht eine Verarmung intrazellulärer Kalziumspeicher mit einer Dissoziation der iPLA<sub>2</sub> von seinem Komplex mit Calmodulin einher, was zu einer Aktivierung des Enzyms führt (Wolf et al. 1997, Jenkins et al. 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die iPLA<sub>2</sub> vermittelte Arachidonsäurefreisetzung positiv von Phosphorylierungsreaktionen der Proteinkinasen C $\alpha$  und C $\epsilon$  abhängig ist (Steer et al. 2002, Akiba und Sato 2004). Beide Prozesse sind in Abbildung 6 dargestellt.



**Abb. 6** Regulationsmechanismen der iPLA<sub>2</sub> modifiziert nach Akiba und Sato 2004

L = Ligand, R = Rezeptor, PKC $\alpha/\epsilon$  = Proteinkinase C $\alpha/\epsilon$

Wie im vorangegangenen Kapitel erläutert, scheint bei der Fas-induzierten Apoptose außerdem die Aktivierung der iPLA<sub>2</sub> über die Caspasenkaskade eine Rolle zu spielen (Atsumi et al. 2000).

### 1.2.5 Indirekte Stoffwechseleffekte

Phospholipide bilden einen umfassenden Speicher für zahlreiche Second Messenger bzw. deren Vorläufer. An der Generierung dieser Botenstoffe sind die Phospholipasen wesentlich beteiligt (vgl. Tabelle 1).

**Tab. 1** aus Phospholipiden gewonnene Second Messenger

Phospholipid	Phospholipase	Second Messenger	Referenz
Phosphatidylcholin Phosphatidylethanolamin Phosphatidylinositol	A <sub>2</sub>	Arachidonsäure Eicosanoide PAF	(Dennis et al. 1991, Farooqui et al. 1997b)
Phosphatidylinositol	C	Diacylglycerin Inositoltriphosphat	(Dennis et al. 1991, Exton 1994)
Phosphatidylcholin	D	Phosphatidsäure Lysophosphatidsäure	(Exton 1997)

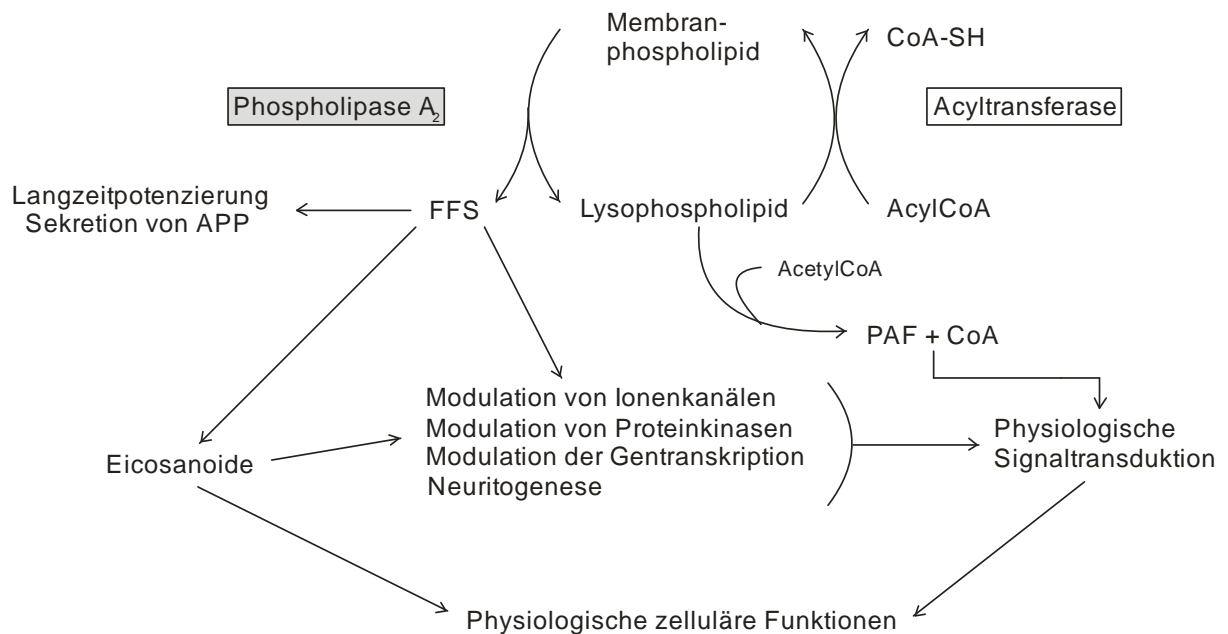
PAF = plättchenaktivierender Faktor

Die PLA<sub>2</sub> realisiert ihre Funktionen durch die Hydrolyse der sn-2 Esterbindung der Phospholipide. Die Produkte dieser Reaktion sind freie Fettsäuren und Lysophospholipide (Six und Dennis 2000). Die Fettsäuren können zum einen als wichtige Energiespeicher angesehen werden, bedeutender ist aber die Rolle der Arachidonsäure und der aus ihr synthetisierten Eicosanoide als Second Messenger. Die Eicosanoide sind wichtige Entzündungsmediatoren und haben umfassende Wirkungen auf das Blut- und Kreislaufsystem (Berk und Stump 1999, Austin und Funk 1999).

Die AA ist neben ihrer Funktion als Second Messenger in die Regulierung von Ionenkanälen und Enzymaktivitäten involviert (Farooqui et al. 1997a). Weiterhin spielt sie in der Regulierung der Genexpression eine Rolle, so wird z. B. die Transkription des Fettsäure-Synthese-Gens durch PUFAs unterdrückt (Jump et al. 1994). Und letztlich ist die AA auch an der Beeinflussung der Membranfluidität, der Neuritogenese und Prozessen der Langzeitpotenzierung (LTP) beteiligt, auf welche in dem Kapitel 1.2.3 bereits eingegangen wurde (Smalheiser et al. 1996, Rosenberger et al. 2003).

Die Lysophospholipide sind ebenfalls in Signaltransduktionsprozesse der Zelle involviert. Sie nehmen Einfluss auf Umbauprozesse der Phospholipide und Permeabilität der Membranen und sind Ausgangsstoff für die Synthese von plättchenaktivierendem Faktor (PAF) (Balsinde et al. 1997, Akiba und Sato 2004).

Einen Überblick über die Wirkung der PLA<sub>2</sub>, ihre Produkte und deren Aufgaben gibt Abbildung 7.



**Abb. 7** Wirkung der PLA<sub>2</sub> und ihrer Produkte modifiziert nach Farooqui et al. 1997 b

FFS = Freie Fettsäuren, APP = Amyloid-Präkursor-Protein, CoA = Coenzym A,  
PAF = plättchenaktivierender Faktor

### 1.3 Klinische Studien zu PLA<sub>2</sub> und Membranstoffwechsel bei Demenz

#### 1.3.1 Veränderungen der PLA<sub>2</sub>-Aktivität

##### Alzheimer Demenz

Zum Verständnis des hier gewählten Untersuchungsansatzes wird nachfolgend die bisher vorliegende Datenlage zu PLA<sub>2</sub>-Veränderungen bei Demenzen dargestellt. Ein Überblick der Studien zur Alzheimer Demenz bietet Tabelle 2.

**Tab. 2** Studien zur PLA<sub>2</sub> im Kontext der AD

Studie	Stichprobe PG / KG	Methode/ Material	untersuchte PLA <sub>2</sub>	PLA <sub>2</sub> - Aktivität PG vs. KG	Korrelationen zw. PLA <sub>2</sub> - Aktivität und Pathologie
<b>Gattaz et al. 1995b</b>	23 / 20 (np)	radiometrisch/ Hirngewebe	Ca <sup>2+</sup> abh. PLA <sub>2</sub>	↓	neg. Korr. zur Zahl der NPs und NFTs
<b>Gattaz et al. 1996</b>	16 / 13 (np)	radiometrisch/ Thrombozyten	Ca <sup>2+</sup> abh. PLA <sub>2</sub>	↓	neg. Korr. zum Ausmaß der kognitiven Störung
<b>Gattaz et al. 2004</b>	21 / 17 (p)	radiometrisch/ Thrombozyten	Ca <sup>2+</sup> unabh. PLA <sub>2</sub>	↓	neg. Korr. zum Ausmaß der kognitiven Störung
<b>Ross et al. 1998</b>	10 / 10 (p)	radiometrisch/ Hirngewebe	Ca <sup>2+</sup> abh./ Ca <sup>2+</sup> unabh. PLA <sub>2</sub>	↓ / ↓	nicht untersucht
<b>Talbot et al. 2000</b>	12 / 12 (p)	radiometrisch/ Hirngewebe	Ca <sup>2+</sup> abh./ Ca <sup>2+</sup> unabh. PLA <sub>2</sub>	n.s. / ↓	nicht untersucht
<b>Stephenson et al. 1996</b>	5 / 6 (np)	immunhistochemisch/ Hirngewebe	Ca <sup>2+</sup> abh. PLA <sub>2</sub>	↑	nicht untersucht

PG = Patientengruppe, KG = Kontrollgruppe, np = nicht parallelisiert, p = parallelisiert,  
Ca<sup>2+</sup>abh. = kalziumabhängig, Ca<sup>2+</sup>unabh. = kalziumunabhängig, neg. = negativ,  
Korr. = Korrelation, NPs = neuritische Plaques, NFTs = neurofibrilläre Tangles,  
n.s. = kein signifikanter Unterschied

Wesentliche Pionierarbeit ist der Arbeitsgruppe um W.F. Gattaz (Zentralinstitut für seelische Gesundheit Mannheim und Institute of Psychiatry, Faculty of Medicine, Sao Paulo) zu verdanken. Sie untersuchten als erste die Aktivität einer intrazellulären PLA<sub>2</sub> an parietalen und frontalen Autopsieproben der Gehirne von 23 Patienten mit histomorphologisch gesicherter AD (Anzahl der weiblichen : Anzahl der männlichen Probanden (n<sub>w</sub> : n<sub>m</sub>) = 16 : 7, Mittelwert (Ø) Alter = 81 ± 8 Jahre) und 20 neuropathologisch unauffälligen Kontroll-

personen ( $n_w : n_m = 10 : 10$ ,  $\bar{O}$  Alter =  $76 \pm 10$  Jahre). Die Bestimmung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität erfolgte mittels eines radioenzymatischen Assays (Gattaz et al. 1995a). Dabei zeigte sich eine signifikant geringere Aktivität der PLA<sub>2</sub> in der Patientengruppe (parietal:  $p < 0,001$ / frontal:  $p < 0,05$ ). Die Werte der parietalen PLA<sub>2</sub>-Aktivität korrelierten in der Patientengruppe positiv mit dem Sterbealter und die der parietalen und frontalen PLA<sub>2</sub>-Aktivität mit dem Alter bei Beginn der Erkrankung. Weiterhin zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der Aktivität der frontalen PLA<sub>2</sub> und der Anzahl amyloider Plaques und neurofibrillärer Tangles.

Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte die PLA<sub>2</sub>-Aktivität an Thrombozyten. Es nahmen 16 Patienten mit klinisch gesicherter AD ( $n_w : n_m = 8 : 4$ ,  $\bar{O}$  Alter =  $70 \pm 11$  Jahre), 13 gesunde ( $n_w : n_m = 4 : 9$ ,  $\bar{O}$  Alter =  $63 \pm 10$  Jahre) und 14 psychiatrische Kontrollen ( $n_w : n_m = 8 : 6$ ,  $\bar{O}$  Alter =  $62 \pm 12$  Jahre) an der Untersuchung teil. Auch hier ergab sich eine signifikante Erniedrigung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität bei Patienten mit AD im Vergleich zu gesunden ( $p < 0,03$ ) und psychiatrischen ( $p < 0,002$ ) Kontrollen. Die Erniedrigung zeigte einen tendenziellen Zusammenhang mit einem früheren Erkrankungsbeginn ( $p < 0,1$ ) und korrelierte signifikant mit dem Ausmaß der kognitiven Störung gemessen anhand des Cambridge Cognitive Examination (CAMCOG)-Scores ( $p < 0,05$ ). Außerdem zeigten Patienten mit einem Mini Mental Status Test (MMST) kleiner als 10 eine signifikant niedrigere Enzymaktivität im Vergleich zu denjenigen mit einem MMST größer als 10 (Gattaz et al. 1996).

In einer weiteren Studie von Gattaz et al. 2004 über die Aktivität der PLA<sub>2</sub> in Thrombozyten an 21 Patienten mit klinisch gesicherter AD ( $n_w : n_m = 15 : 6$ ,  $\bar{O}$  Alter =  $75 \pm 7$  Jahre), 11 Patienten mit Mild cognitive impairment (MCI) ( $n_w : n_m = 10 : 1$ ,  $\bar{O}$  Alter =  $73 \pm 5$  Jahre) und 17 altersangepassten Kontrollpersonen ( $n_w : n_m = 13 : 4$ ,  $\bar{O}$  Alter =  $73 \pm 5$  Jahre) wurde unter Einsatz des iPLA<sub>2</sub> spezifischen Antagonisten Bromoenol Lacton (BEL) eine genauere Zuordnung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität erreicht. Unter Zusatz von BEL verringerte sich die Aktivität der gemessenen PLA<sub>2</sub> um 73 %, so dass davon ausgegangen wurde, dass der Hauptteil der radiometrisch erfassten Enzymaktivität der iPLA<sub>2</sub> zuzuschreiben ist. Auch in dieser Studie von Gattaz et al. konnte eine signifikant geringere Aktivität der PLA<sub>2</sub> in der Gruppe der Patienten mit AD gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden ( $p < 0,001$ ). Die Werte der Patienten mit MCI lagen zwischen denen der Kontrollgruppe und denen der Patienten mit AD, erreichten jedoch keine signifikante Abgrenzung. Eine geringere PLA<sub>2</sub>-Aktivität korrelierte mit geringeren Werten im MMST ( $p = 0,002$ ) und CAMCOG ( $p = 0,002$ ). Die Arbeitsgruppe untersuchte weiterhin den Einfluss der Einnahme von Acetylcholinesterasehemmern und Neuroleptika auf die PLA<sub>2</sub>-Aktivität. Hier fanden sich keine Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Behandlung durch Acetylcholinesterasehemmer. Allerdings

zeigten AD-Patienten unter Neuroleptikatherapie eine geringere Aktivität der PLA<sub>2</sub> als diejenigen ohne Neuroleptikabehandlung ( $p = 0,01$ ). Ein anschließender Ausschluss der AD-Patienten, die Neuroleptika einnahmen, ergab jedoch ebenfalls noch signifikant verminderte Werte der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Thrombozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p = 0,01$ ). Eine Korrelation zwischen PLA<sub>2</sub>-Aktivität und Beginn der Erkrankung konnte in dieser Studie nicht aufgedeckt werden (Gattaz et al. 2004).

Neben der Arbeitsgruppe um W. F. Gattaz haben sich bisher nur wenige Forscher PLA<sub>2</sub>-Veränderungen bei Demenzen zugewandt.

Ross et al. untersuchten mittels eines radiometrischen Verfahrens die Aktivität verschiedener, sich sowohl katabolisch als auch anabolisch auf den Phospholipidstoffwechsel auswirkender, Schlüsselenzyme in morphologisch verändertem und unverändertem Hirngewebe von 10 autopsierten Patienten mit klinisch und histopathologisch gesicherter Alzheimer Demenz ( $n_w : n_m = 5 : 5$ ,  $\bar{X}$  Alter =  $75 \pm 3$  Jahre) und 10 gesunden Kontrollpersonen ( $n_w : n_m = 5 : 5$ ,  $\bar{X}$  Alter =  $73 \pm 2$  Jahre). Um herauszufinden, ob die Ergebnisse ihrer Untersuchungen vielleicht nur unspezifische Folgen der Neurodegeneration sind, wurde zusätzlich der zerebelläre Kortex von 9 Patienten mit genetisch bestätigter Spinozerebellärer Ataxie Typ I sowie von 11 parallelisierten Kontrollpersonen untersucht. Im Ergebnis erhielt die Forschergruppe eine signifikant verminderte Aktivität der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen PLA<sub>2</sub> sowohl im parietalen Kortex (-41 %), temporalen Kortex (-38 %) und hippokampal (-18 %) als auch der Aktivität der iPLA<sub>2</sub> im parietalen (-35 %) und temporalen (-44 %) Kortex. Weiterhin erhielten Ross et al. in den untersuchten Großhirnregionen signifikant erhöhte Aktivitäten der Lyso-phospholipid-Acyltransferase, welche Lysophospholipide zu intakten Phospholipiden recycelt und der Glycerophosphocholin-Phosphodiesterase, welche Phospholipidmetabolite der Phospholipidresynthese zuführt. Die Aktivität dieser Enzyme und die der PLA<sub>2</sub> zeigten im zerebellären Kortex der Patienten mit Spinozerebellärer Ataxie keine Veränderungen, woraus geschlossen wurde, dass die Veränderungen keine unspezifischen Konsequenzen degenerativer Veränderungen sind (Ross et al. 1998).

Eine verminderte Aktivität der iPLA<sub>2</sub> in der frontalen Variante der AD ergaben auch die Untersuchungen von Talbot et al. Hier wurde die iPLA<sub>2</sub>- und cPLA<sub>2</sub>-Aktivität im dorso-lateralen präfrontalen und lateralen temporalen Kortex von 12 Patienten mit frontaler AD ( $n_w : n_m = 3 : 9$ ,  $\bar{X}$  Alter =  $76 \pm 2$  Jahre) und 12 parallelisierten Kontrollpersonen ( $n_w : n_m = 8 : 4$ ,  $\bar{X}$  Alter =  $80 \pm 4$  Jahre) untersucht. Die Messungen erfolgten auch hier mittels eines radiometrischen Assays (Jolly et al. 1993). Im dorsolateralen präfrontalen Kortex der Patienten fand sich eine signifikante Verminderung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität ( $p < 0,01$ ).

Die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität lateral temporal ergab keine signifikanten Unterschiede. Ebenso wurden in keiner Region Veränderungen der Aktivität der cPLA<sub>2</sub> gefunden (Talbot et al. 2000).

Stephenson et al. schließlich untersuchten in einer immunhistochemischen Studie die Immunreaktivität der cPLA<sub>2</sub> in Astrozyten im occipitalen Kortex und im Zerebellum an 5 Patienten mit AD ( $n_w : n_m = 4 : 1$ ,  $\bar{O}$  Alter =  $83 \pm 5$  Jahre) und 6 Kontrollpersonen ( $n_w : n_m = 1 : 5$ ,  $\bar{O}$  Alter =  $68 \pm 16$  Jahre). Hier zeigte sich eine erhöhte Immunreaktivität der cPLA<sub>2</sub> im Bereich des Kortexes (Stephenson et al. 1996).

Ergänzend soll an dieser Stelle die Studie von van Oijen et al. dargestellt werden. Diese Arbeitsgruppe untersuchte den Gehalt einer Lipoproteinassozierten PLA<sub>2</sub> (Lp-PLA<sub>2</sub>) als Risikofaktor für das Entstehen einer Demenz. Es handelt sich hierbei um eine Fall-Kohorten-Studie mit 1742 Personen, welche zufällig aus einer Gruppe von 6713 Probanden ausgewählt wurden, die im Zuge der so genannten Rotterdam-Studie untersucht worden waren. Bei der Rotterdam-Studie handelt es sich um eine prospektive Kohortenstudie, in welcher ein hoher Gehalt an Lp-PLA<sub>2</sub> als prädiktiver Faktor für das Entstehen von Koronarer Herzkrankheit und Schlaganfällen ausgemacht werden konnte. Die Untersuchung des Enzyms erfolgte im Blutplasma mittels radiometrischem Assay (Hofman et al. 1991). Bei der Lp-PLA<sub>2</sub> handelt es sich um eine PAF-Acetylhydrolase, die den hydrolytischen Abbau der Acetylgruppe der sn-2 Position des PAF katalysiert, wodurch Lyso-PAF und Essigsäure entstehen (Blank et al. 1981, Stafforini et al. 1987). Mittels einer Cox Proportional Hazard Analyse fanden van Oijen et al. heraus, dass erhöhte Level an Lp-PLA<sub>2</sub> mit einem erhöhten Risiko einhergehen, später an einer Demenz zu erkranken (van Oijen et al. 2006).

Zusammenfassend erhält man eine hohe Übereinstimmung bezüglich einer verminderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität bei AD. Insgesamt drei Arbeitsgruppen fanden dieses Enzym in seiner Aktivität vermindert. Weiterhin handelt es sich um den einzigen replizierten Befund in post mortem Untersuchungen von Hirngewebe. Die Studien zur cPLA<sub>2</sub> ergaben dreimal eine verminderte Aktivität, einmal keine Veränderungen und einmal eine Erhöhung der Enzymaktivität gegenüber der Kontrollgruppe. Eine erhöhte Lp-PLA<sub>2</sub> wurde als ein Risikofaktor beschrieben, später eine Demenz zu entwickeln. Bisher gibt es nach unserem Kenntnisstand keine in vivo Untersuchungen der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in einem ZNS nahen Kompartiment. Diesem Anliegen folgt die vorliegende Studie. Erstmalig ist es gelungen, die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> in dem in vivo erreichbaren zentralen Kompartiment Liquor zu messen. Dadurch konnte das Gewicht der Untersuchung auf Veränderungen der Enzymaktivität im zentralen Nervensystem gelegt werden.

## Zentrale Ischämie

Die Ausführungen beziehen sich bis zu diesem Punkt vor allem auf Untersuchungen zur Alzheimer Demenz. Zur Bedeutung der PLA<sub>2</sub> für Prozesse der Vaskulären Demenz (VD) gibt es bis dato keine direkten Untersuchungen. Es finden sich jedoch Studien zur PLA<sub>2</sub>-Aktivität bei zerebraler Ischämie. Das Problem ist hier, dass in der Regel akute Ereignisse untersucht wurden und damit Rückschlüsse auf Veränderungen bei VD nicht ohne weiteres zulässig sind. Einigkeit herrscht darüber, dass der wegfallende Blutfluss im Falle des ischämischen Insults zu zahlreichen physiologischen und biochemischen Veränderungen, wie Energieverlust, Freisetzung exzitatorischer Transmitter, Depolarisation neuronaler Membranen und Kalziumeinstrom in die Zellen führt. Viele dieser Veränderungen gehen wiederum mit einer Erhöhung des oxidativen Stresses und neuronalem Zelltod einher (Chan 1996, Sun et al. 2004). In mehreren Studien konnte ein erhöhter Gehalt freier Fettsäuren in Folge eines an Ratten induzierten zerebralen, ischämischen Ereignisses festgestellt werden (Zhang und Sun 1995, Bazan 1970). Pilitsis et al. fanden durch den Einsatz verschiedener Phospholipase-inhibitoren heraus, dass dieser Anstieg vermutlich auf eine erhöhte Aktivität der cPLA<sub>2</sub> zurückzuführen ist (Pilitsis et al. 2002). Dieses Ergebnis wird durch eine immunhistochemische Studie von Stephenson et al. unterstützt, welche eine erhöhte cPLA<sub>2</sub>-Aktivität in reaktivem Gliagewebe nach globaler zerebraler Ischämie postuliert (Stephenson et al. 1999).

In der vorliegenden Untersuchung wurden nach derzeitiger Studienlage das erste Mal die Veränderungen der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität bei Vaskulärer Demenz untersucht. Damit soll ein Ausgangspunkt für weitere Forschung auf diesem Gebiet geschaffen werden.



### 1.3.2 Veränderungen des Membranstoffwechsels

Zu den Veränderungen in der Konzentration der Membranphospholipide und deren Metaboliten bei Patienten mit AD gibt es zahlreiche Studien. Da die PLA<sub>2</sub> wie oben erläutert wesentlich in den Abbau der Membranphospholipide involviert ist, sollen bedeutende Ergebnisse im Folgenden kurz dargestellt werden.

Das Verhältnis von Lysophosphatidylcholin (Lyso-PC), welches aus Phosphatidylcholin (PC) nach Abspaltung der Fettsäure in der sn-2 Position durch die PLA<sub>2</sub> entsteht, zu PC im Liquor von Patienten mit Alzheimer Demenz untersuchten Mulder et al. bei Patienten mit Alzheimer Demenz und bei Patienten mit subjektiven Gedächtnisbeschwerden, bei welchen eine demenzielle Entwicklung, unter anderem aufgrund eines Beobachtungszeitraumes von einem halben bis zu einem Jahr, ausgeschlossen werden konnte. Die Quantifizierung von Lyso-PC und PC erfolgte mittels Tandemmassenspektrometrie (Scheffer et al. 2001). Dabei ergaben sich zwar keine signifikanten Unterschiede des totalen Gehaltes an Lyso-PC bzw. PC, aber eine signifikante Verminderung des Lyso-PC/ PC-Verhältnisses in der Gruppe der Patienten mit AD (Mulder et al. 2003).

In einer post mortem Untersuchung an neurodegenerativen Regionen in Gehirnen von AD-Patienten fanden Edlund et al. erhöhte Konzentrationen des Membranphospholipids Phosphatidylinositol und eine Verminderung des Gehaltes ungesättigter Fettsäuren in Phosphatidylethanolamin (Edlund et al. 1992).

Verminderte Level an Phosphatidylcholin und –ethanolamin und der Vorstufen Cholin und Ethanolamin sowie erhöhte Spiegel des Deacetylierungsprodukts Glycerophosphocholin (GPC) in Gehirnproben von Patienten mit AD im Vergleich zu einer Kontrollgruppe fand die Arbeitsgruppe um Nitsch et al. (Nitsch et al. 1992).

Und auch in einer Studie von Walter et al. ergaben sich erhöhte Konzentrationen an Glycerophosphocholin, Phosphocholin und freiem Cholin, den Abbauprodukten des Phosphatidylcholins, im Liquor von AD-Patienten verglichen mit der Kontrollgruppe (Walter et al. 2004).

Prasad et al. fanden einen verminderten Gehalt an Phosphatidylethanolamin und –inositol in der Hippokampusregion und dem unteren Parietallappen von AD-Patienten (Prasad et al. 1998).

Angeregt durch die Liquor- und post mortem Befunde kamen in einigen Studien auch MR-basierte in vivo Verfahren zur Anwendung. Bei der <sup>31</sup>P-Phosphor-Magnet-Resonanz-Spektroskopie (<sup>31</sup>P-MRS) handelt es sich um ein noninvasives Verfahren, mit welchem

relative Molekülkonzentrationen bestimmter phosphathaltiger Verbindungen anhand ihrer Resonanzfrequenzen ermittelt werden können.

In einer Studie von Brown et al. wurden die Resonanzen von Phosphomonoestern (PME) und Phosphodiestern (PDE) bestimmt. Die Resonanzen der PME spiegeln den Gehalt der Membranphospholipidvorstufen wider, während die der PDE eher die Membranphospholipidabbauprodukte reflektieren. Es fanden sich erhöhte Werte für die PME und erhöhte PME/ PDE-Quotienten in den temporoparietalen Regionen von Patienten mit AD, was auf einen reduzierten Abbau von Membranphospholipiden hindeutet (Brown et al. 1989).

Dieser Befund konnte von Forlenza et al. bestätigt werden. Auch diese Arbeitsgruppe fand erhöhte Werte für die PME und ein erhöhtes Verhältnis von PME zu PDE bei Patienten mit AD. Auch sie interpretierten dieses Ergebnis im Sinne eines verminderten Membranphospholipidabbaus (Forlenza et al. 2005).

Untersuchungen von Cuenod et al. zeigten eine Erhöhung der PME-Resonanzen bereits in der frühen Erkrankungsphase der AD (Cuenod et al. 1995).

Ein Anstieg des PME/ PDE-Quotienten fand sich auch bei Patienten mit AD in der  $^{31}\text{P}$ -MRS-Studie von Gonzales et al., hier jedoch vor allem durch einen verminderten Gehalt an PDE bedingt (Gonzalez et al. 1996).

Kwee et al. konnten mittels  $^{31}\text{P}$ -MRS eine Erhöhung der PUFAs an neuronalen Membranen bei Patienten mit AD im Vergleich zu gesunden Kontrollen aufzeigen (Kwee et al. 1991).

Die  $^{31}\text{P}$ -MRS kann auch für die Beurteilung der Phospholipidmetaboliten post mortem genutzt werden. In einer solchen Untersuchung fand sich ein Anstieg von GPC in Lipidextrakten aus Gehirnen von AD-Patienten im Vergleich zu den Lipidextrakten der Gehirne der Kontrollpersonen (Barany et al. 1985).

Pettegrew et al. erhielten in ihrer post mortem Studie mittels  $^{31}\text{P}$ -MRS an neuronalen Membranen von Patienten mit AD verglichen mit gesunden Kontrollpersonen verminderte Phosphatidylinositol- und Phosphatidylethanolamin-Spiegel (Pettegrew et al. 2001).

Insgesamt ergibt sich in den Untersuchungen der Membranstoffwechselprozesse bei AD ein heterogenes Bild. Interessanterweise findet sich jedoch in den in vivo Studien mittels  $^{31}\text{P}$ -MRS einheitlich ein verminderter Membranabbau. Zukünftige in vivo Untersuchungen mittels  $^{31}\text{P}$ -MRS in Kombination mit Aktivitätsmessungen der  $\text{PLA}_2$  im Liquor könnten die vermuteten Zusammenhänge zwischen Enzymaktivität und Membransatz verifizieren.

## 2 Ziele der Arbeit

Die Intention der vorliegenden Arbeit basiert auf der Annahme eines veränderten Phospholipidstoffwechsels bei demenziellen Erkrankungen, der mit Veränderungen der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität einhergeht. Mittels eines fluorometrischen, iPLA<sub>2</sub>-sensitiven Verfahrens soll erstmalig die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor untersucht werden (Lasch et al. 2003). Bei dem Untersuchungsmaterial Liquor handelt es sich um das den neuropathologischen Veränderungen nächste in vivo analysierbare Medium. Initiales Anliegen war es, die Identität von PLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor zweifelsfrei als iPLA<sub>2</sub>-Aktivität zu klären und damit die Vergleichbarkeit zu Vorarbeiten im Serum zu gewährleisten.

Neben der im Vordergrund stehenden Untersuchung von Patienten mit Alzheimer Demenz sollen auch andere demenzielle Erkrankungen, unter anderem die Vaskuläre Demenz und die Demenz vom Mischtyp aus Vaskulärer und Alzheimer Demenz in die Studie einbezogen werden. Ziel der Arbeit ist es weiterhin, den Einfluss des Erkrankungsstadiums, epidemiologischer Parameter (Alter, Geschlecht) sowie der Medikation (ASS 100 mg/d, Acetylcholinesterasehemmer) auf die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> zu charakterisieren. Langfristig könnte es durch das verbesserte Verständnis lipidmetabolischer Pathomechanismen demenzieller Erkrankungen zu neuen therapeutischen Ansatzpunkten kommen.

Die zu überprüfenden Arbeitshypothesen lauten folgendermaßen:

1. Die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität ist gleichermaßen im Liquor und im Serum nachweisbar.
2. Die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität ist in den Patientengruppen mit AD, VD und AVD im Gegensatz zu gesunden Kontrollpersonen vermindert.
3. Das Ausmaß der verminderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung.
4. Das Alter der Probanden, ihr Geschlecht und die Einnahme von ASS 100 bzw. von Acetylcholinesterasehemmern haben keinen Einfluss auf die Aktivität der iPLA<sub>2</sub>.

Sofern die Gruppengrößen es zulassen, sollen explorativ auch Patienten mit Frontotemporaler Demenz, Lewy-Körper-Demenz, Demenz bei Normaldruckhydrozephalus, Korsakow-Syndrom, Creutzfeld-Jacob-Demenz, Demenz bei Morbus Parkinson und Fataler Familiärer Insomnie untersucht werden.

### 3 Methodik

#### 3.1 Patienten

##### Charakterisierung der Studiengruppe

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit klinisch gesicherter Demenz sowie psychisch gesunde Kontrollpersonen aus der neurologischen Klinik auf die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen  $\text{PLA}_2$  in Serum und Liquor untersucht.

Die Teilnahme war freiwillig und alle Patienten erklärten nach umfassender schriftlicher und mündlicher Aufklärung schriftlich ihr Einverständnis, einen Teil des zur Routinediagnostik gewonnenen Serums und Liquors für die Messung der  $\text{iPLA}_2$ -Aktivität zur Verfügung zu stellen. War die Einwilligungsfähigkeit durch die demenzielle Erkrankung erkennbar beeinträchtigt, wurden Vorsorgebevollmächtigte und Betreuer für Gesundheitsorge hinzugezogen. In keinem Fall erfolgte der Gebrauch des Probenmaterials gegen den Willen des Probanden. Ebenso wurde in keinem Fall Probenmaterial ausschließlich zu Studienzwecken entnommen.

Insgesamt nahmen 101 Probanden an der Untersuchung teil, die in der Zeit von Januar 2001 bis September 2004 sukzessive in die psychiatrische Klinik zur Demenzabklärung bzw. zur Liquorpunktion aus anderer Indikation in die neurologische Klinik (Kontrollpersonen) stationär eingewiesen wurden. Die Messergebnisse von 5 Personen mit schizophrener Symptomatik, von 7 Personen mit entzündlichen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (u. a. Meningitiden, Neuroborreliosen) sowie von 12 Personen, bei denen die demenzielle Entwicklung nicht zweifelsfrei charakterisiert werden konnte, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die für die Untersuchungen verwandte Gruppe umfasste somit 77 Personen, darunter 34 weiblich und 43 männlich, siehe auch Tabelle 3. Die Kontrollgruppe ( $n = 19$ ) mit 9 weiblichen und 10 männlichen Probanden war deutlich kleiner als die gesamte Patientengruppe ( $n = 58$ ) mit 25 weiblichen und 33 männlichen Probanden. In letzterer erfolgte jedoch eine weitere Subgruppierung. Die Gruppe der Patienten mit Alzheimer Demenz ( $n = 16$ ) umfasste 7 weibliche und 9 männliche, die der Patienten mit vaskulärer Demenz ( $n = 12$ ) 6 weibliche und 6 männliche Patienten. Die Gruppe der Patienten mit einer Mischform aus beiden Demenzformen ( $n = 15$ ) umfasste 7 weibliche und 8 männliche Patienten. Weiterhin wurde die Gruppe der Patienten mit Frontotemporaler Demenz ( $n = 5$ ) mit einem weiblichen

und 4 männlichen Patienten in die Untersuchungen mit einbezogen, um auch hier eventuell vorhandene Veränderungen der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in ihrer Tendenz zu entdecken.

Bei den darüber hinaus diagnostizierten demenziellen Erkrankungen reichte die Stärke der Subgruppen für eine statistische Betrachtung nicht aus (vgl. Tabelle 3). Sie wurden beschreibend ausgewertet.

Das durchschnittliche Alter (Mittelwert) der Kontrollgruppe betrug  $63 \pm 15$  Jahre (Median 62,0), das der Patientengruppe  $72 \pm 11$  Jahre (Median 77,0). Eine genaue Betrachtung der einzelnen Patientengruppen ist Tabelle 3 zu entnehmen.

**Tab. 3** Epidemiologische Daten zur untersuchten Gruppe

	gesamt		weiblich		männlich		$n_w : n_m$
	$n_g$	$\bar{\text{Ø}} \text{ Alter}$ (in Jahren)	$n_w$	$\bar{\text{Ø}} \text{ Alter}$ (in Jahren)	$n_m$	$\bar{\text{Ø}} \text{ Alter}$ (in Jahren)	
<b>Gesamtstichprobe</b>	77	$70 \pm 12$	34	$73 \pm 12$	43	$69 \pm 12$	0,8
<b>Kontrollgruppe</b>	19	$63 \pm 15$	9	$57 \pm 12$	10	$67 \pm 16$	0,9
<b>Patientengruppe<sub>ges.</sub></b>	58	$73 \pm 11$	25	$78 \pm 7$	33	$69 \pm 11$	0,8
<b>Patientengruppe<sub>AD, VD, AVD</sub></b>	43	$75 \pm 8$	20	$79 \pm 6$	23	$72 \pm 8$	0,9
<b>AD</b>	16	$73 \pm 8$	7	$80 \pm 2$	9	$69 \pm 7$	0,8
<b>VD</b>	12	$75 \pm 5$	6	$76 \pm 6$	6	$74 \pm 5$	1
<b>AVD</b>	15	$77 \pm 10$	7	$80 \pm 9$	8	$75 \pm 10$	0,9
<b>FTD</b>	5	$53 \pm 10$	1	67	4	$50 \pm 8$	0,3
<b>LKD</b>	3	$77 \pm 9$	2	$81 \pm 9$	1	70	2
<b>NPH</b>	2	$84 \pm 0$	0		2	$84 \pm 0$	
<b>Ko-S</b>	2	$69 \pm 4$	1	72	1	66	1
<b>CJD</b>	1	49	0		1	49	
<b>DP</b>	1	70	1	70	0		
<b>FFI</b>	1	65	0		1	65	

$n_g$  = Anzahl der männlichen und weiblichen Probanden,

$n_w$  = Anzahl der weiblichen Probandinnen,

$n_m$  = Anzahl der männlichen Probanden,  $\bar{\text{Ø}}$  = Mittelwert, <sub>ges</sub> = gesamt

Die Gruppen der Patienten mit Alzheimer Demenz, Vaskulärer Demenz und Demenz vom Mischtyp aus Alzheimer und Vaskulärer Demenz wurden noch einmal in drei Schweregrade unterteilt, siehe Tabelle 4.

**Tab. 4** Gruppengrößen der in drei Schweregrade unterteilten AD, VD und AVD

	<b>gesamt</b>	<b>leicht</b>	<b>mittelschwer</b>	<b>schwer</b>
	<b>n</b>	<b>n</b>	<b>n</b>	<b>n</b>
<b>AD</b>	16	8	3	5
<b>VD</b>	12	4	5	3
<b>AVD</b>	15	3	8	4
<b>AD und AVD</b>	31	11	11	9

Aufgrund des hohen Alters und der Multimorbidität vieler der untersuchten Patienten nahmen die meisten von ihnen eine Vielzahl von Medikamenten ein. Ein Zusammenhang zwischen PLA<sub>2</sub>-Aktivität und der Einnahme von ASS 100 (eingesetzt zur Sekundärprophylaxe) sowie von Acetylcholinesterasehemmern wurde genauer untersucht (vgl. Kapitel 4.2.6).

Da von 25 Probanden (8 Personen der Kontrollgruppe, 7 Patienten mit Vaskulärer Demenz, 6 Patienten mit Alzheimer Demenz, 2 Patienten mit Demenz vom Mischtyp und ein Patient mit Demenz bei Morbus Parkinson) keine Serumproben zur Verfügung standen, gehen bei den von den Serumwerten abhängigen Analysen entsprechend weniger Probanden ein.

#### Erfassung der Probandendaten

Bei allen Probanden wurde eine standardisierte Basisdokumentation erhoben. Die hier relevanten Daten bezogen sich auf die Erfassung somatischer, neurologischer, psychopathologischer und neuropsychologischer Befunde, Serum- und Liquordiagnostik, radiologischer und elektrophysiologischer Diagnostik, Medikamenteneinnahme und Familienanamnese. Außerdem war es möglich, einen Großteil der Patienten über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Diese Daten wurden in einer SPSS-Tabelle zusammengetragen, deren Aufbau im Anhang eingesehen werden kann. Nachdem behandelbare somatische Ursachen für die demenzielle Symptomatik ausgeschlossen waren, erfolgte die weitere Diagnosestellung anhand der aktuellen ICD-10-Kriterien, die ebenfalls im Anhang aufgeführt sind. Die AD wurde außerdem mit Hilfe der Kriterien des National Institute of Neurological and Communicative Disorders - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association

(NINCDS-ADRDA-Kriterien) klassifiziert, welche auch in der Schweregradeinteilung Anwendung fanden (McKhann et al. 1984). Zur Diagnosestellung einer VD kamen unter anderem zusätzlich die Kriterien des National Institute of Neurological Disorders and Stroke - Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences (NINDS-AIREN-Kriterien) und die Kriterien des Alzheimer Disease Diagnostic and Treatment Center (ADDTC-Kriterien) zur Anwendung (Roman et al. 1993, Chui et al. 1992). Letztere konnten ebenfalls für die Differenzierung des Schweregrades genutzt werden.

Der Schwerpunkt der differenzierenden Diagnosestellung lag auf der neuropsychologischen Testung, welche für alle Patienten von den hierfür spezialisierten Diplom-Psychologen der psychiatrischen Klinik durchgeführt wurde. Dabei wurde zunächst versucht, das prämorbid Leistungsniveau zu bestimmen (Wolfram und Wieczorek 1990). Anschließend kamen verschiedene Kriterien, Tests und Subtests zur Überprüfung des Kurz- und Langzeitgedächtnisses, der Aufmerksamkeit und Konzentration, der konstruktiven Praxis, des planenden, logischen und kritischen Denkens sowie der Exekutivfunktionen zur Anwendung. Die hier auftretenden Abweichungen vom Altersdurchschnitt wurden zusammengefasst und mit dem prämorbidem Leistungsniveau verglichen. Bei allen Demenzformen erfolgte die orientierende Überprüfung mit dem MMST (Folstein et al. 1975). Bei der Differentialdiagnostik von AD, VD und FTD waren die von Kessler und Kalbe aufgestellten neuropsychologischen Charakteristika verschiedener demenzieller Erkrankungen hilfreich (Kessler und Kalbe 2000). Differenzierend wurden bei Verdacht auf eine Alzheimer Demenz außerdem Teile der Testserie des Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD-Testserie) und Untersuchungen zur Informationsverarbeitungsgeschwindigkeit mittels Trail Making Test oder Zahlenverbindungstest aus dem Nürnberger Altersinventar durchgeführt, um frühe Stadien der AD nicht zu übersehen. Untersuchungen zur Prüfung des planerischen und visuell-räumlichen Denkens, wie z. B. der Uhrentest, kamen ebenfalls zur Anwendung (Satzger et al. 2001, Oswald und Fleischmann 1999, Seigerschmidt et al. 2002). Bei unklaren Befunden wurden die Untersuchungen durch das Geschichten-Nacherzählen aus dem Wechsler-Gedächtnistest und das verzögerte passive Wiedererkennen von zehn Bildern in einer Auswahl von 20 ergänzt (Härting et al. 2000). Bei Verdacht auf eine vaskuläre Genese der Demenz erfolgte die Abgrenzung mittels des Hachinski-Ischämie-Scores (Loeb und Gandolfo 1983). In der Diagnostik der FTD waren neben den Kriterien von Neary et al. vor allem fremdanamnestic Angaben relevant, die unter anderem mit Hilfe des Frontal Behavioral Inventory – Fremdanamnesebogens erhoben wurden (Kertesz et al. 2000). Für die Differenzierung der Lewy-Körper-Demenz (LKD) kamen die Konsensuskriterien nach

McKeith et al. zur Anwendung (McKeith et al. 1996). Die Demenz bei Morbus Parkinson wurde durch die neurologische Symptomatik und die bei dieser Demenzform im Vordergrund stehenden Planungsstörungen und Schwierigkeiten in der Konzeptbildung diagnostiziert (Bartels 2005). Beim NPH, dem Ko-S, der CJD und der FFI spielte die differenzierende neuropsychologische Testung eine geringere Rolle. Hier standen Klinik und apparative Zusatzuntersuchungen im Vordergrund der Diagnostik.



### 3.2 Untersuchungsmaterialien

Als Substrat zur Untersuchung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität wurde NBDC<sub>6</sub>-HPC (2-(6-(7-nitro-benz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino-hexanoyl-1-hexa-decanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin)) der Firma Molecular Probes Europe BV (Leiden, Niederlande) eingesetzt. Dieselbe Firma stellte auch das Substrat PED<sub>6</sub><sup>®</sup> (N-(6-(2,4-dinitro-phenyl)aminohexyl)-2-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-Bora-3a,4a-diaza-s-inda-cene-3-pentanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-phosphatidyl-ethanol-amine, triethylammonium Salz) her, welches im Vorfeld der Identifizierung der PLA<sub>2</sub> im Liquor diente. Die Trennung des Reaktionsgemisches erfolgte auf HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatographie)-Platten (Kieselgel 60, 5 % 5 cm, Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Visualisierung des Reaktionsproduktes fand mit Hilfe des UV-Transilluminators PHERO-LUM (Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen, Deutschland), die Registrierung mit dem Programm Movie Machine II (Fast Multimedia AG, München, Deutschland) statt. Die Anzahl der Bildpunkte wurde mit dem Analyseprogramm BASYS 1D (Biotec-Fischer) analysiert.

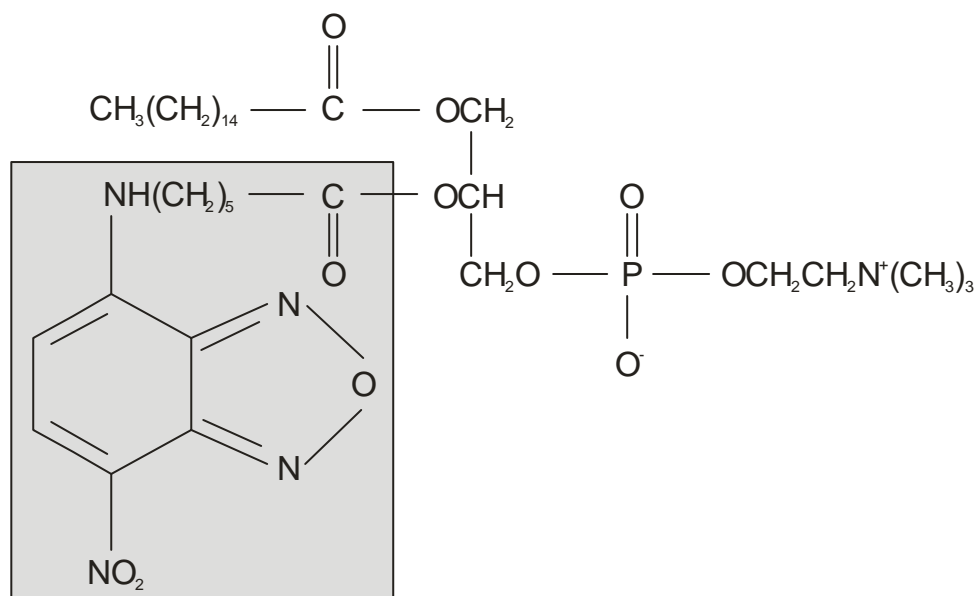
### 3.3 Methode

#### Probengewinnung

Die Abnahme des Liquors erfolgte durch atraumatische Punktionstechnik. Er wurde wie auch das Serum, welches aus zeitgleich entnommenem venösen Blut gewonnen wurde, bei  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  portioniert in Glasröhrchen tiefgefroren und erst zu Messzwecken wieder aufgetaut. Die Lagerung bzw. Analyse der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität erfolgte im Institut für Physikalische Chemie der Martin-Luther-Universität in Halle. Dass die Lagerung über mehrere Monate bei  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  die Enzymaktivität nicht beeinflusst, konnte in einer separaten Testreihe festgestellt werden. Bedingung hierfür war lediglich die Gewährleistung der Homogenität der Probe, welche durch gründliches Durchmischen des Liquors bzw. zusätzliche erneute Zentrifugation der Serumproben gewährleistet werden konnte (Lasch et al. 2003).

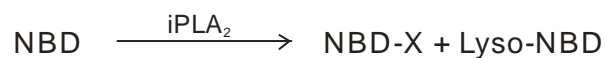
#### NBD-Methode

Die Bestimmung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität erfolgte mit einer auf der fluorometrischen Thin Layer Chromatographie (TLC) basierenden Methode (Lasch et al. 2003). Das hierfür verwandte, fluoreszierende Substrat NBDC<sub>6</sub>-HPC, welches im Folgenden kurz als NBD-PC bezeichnet wird, gab dieser Methode ihren Namen. NBD-PC ist ein Phospholipidanalogon, an welches in der sn-2 Position eine fluorochrome Gruppe in Form einer modifizierten Fettsäure gebunden ist, welche als NBD-X bezeichnet wird. Die Strukturformel von NBD-PC zeigt Abbildung 8.



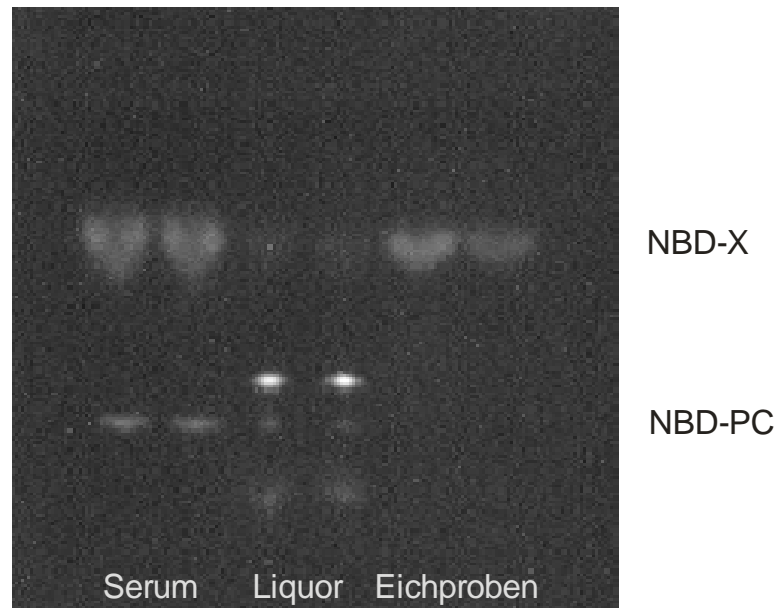
**Abb. 8** Strukturformel des NBD-PC mit fluorogener Gruppe NBD-X (grau unterlegt)

Der Reaktionsansatz für die Messungen im Liquor wurde aus 80 µl unverdünntem Liquor, 10 µl Hepes-Puffer (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane-sulfonic acid) pH 7,4 0,4 M und 10 µl des Substrats NBD-PC (200 µM) hergestellt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Der Serumansatz wurde aus 10 µl mit Hepes-Puffer pH 7,4 0,05 M 1 : 30 verdünntem Serum, 80 µl Hepes-Puffer pH 7,4 0,05 M und 10 µl NBD-PC (200 µM) hergestellt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte die Auftragung von zweimal je 1 µl Reaktionsansatz auf HPTLC-Dünnschichtplatten zusammen mit den Eichproben NBD-X 4 µM und 8 µM. Der erste Eichwert, NBD-X 4 µM, entspricht einer Lösung aus 480 µl Hepes-Puffer pH 7,4 0,05 M, 500 µl RSA-Stammlösung (14 mg/ml Hepes) und 20 µl NBD-X 200 µM. Der zweite Eichwert, NBD-X 8 µM, entspricht einer Lösung aus 460 µl Hepes-Puffer pH 7,4 0,05 M, 500 µl RSA-Stammlösung (14 mg/ml Hepes) und 40 µl NBD-X 200 µM. Durch die Verwendung der Eichproben konnte zum einen eine eindeutige Identifizierung der NBD-X-Bande gewährleistet werden. Zum anderen wurde sichergestellt, dass nur die durch die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität entstandenen Produkte gemessen werden. Zwischen jeder Auftragung wurde die Spritze mit Cyclohexan und Ethanol gespült. Es folgte die Trocknung der Platten 5 min bei Raumtemperatur und 5 min bei 37 °C. Im Anschluss erfolgte die chromatographische Trennung, welche sicherstellte, dass die Fluoreszenz des Produktes (NBD-X) getrennt von der Fluoreszenz des Restsubstrats (NBD-PC) gemessen wurde. Die Trennung erfolgte im DESAGA-System 1201 35 unter Verwendung des Laufmittels nach Fisher (6,5 ml Chloroform + 3,5 ml Methanol + 0,5 ml Ammoniak + 0,25 ml H<sub>2</sub>O dest.) über einen Zeitraum von 7 bis 8 min. Die gesamte Messdurchführung fand unter abgedunkelten Bedingungen statt. Die Aufspaltung des NBD-PCs ist in der Abbildung 9 schematisch dargestellt.



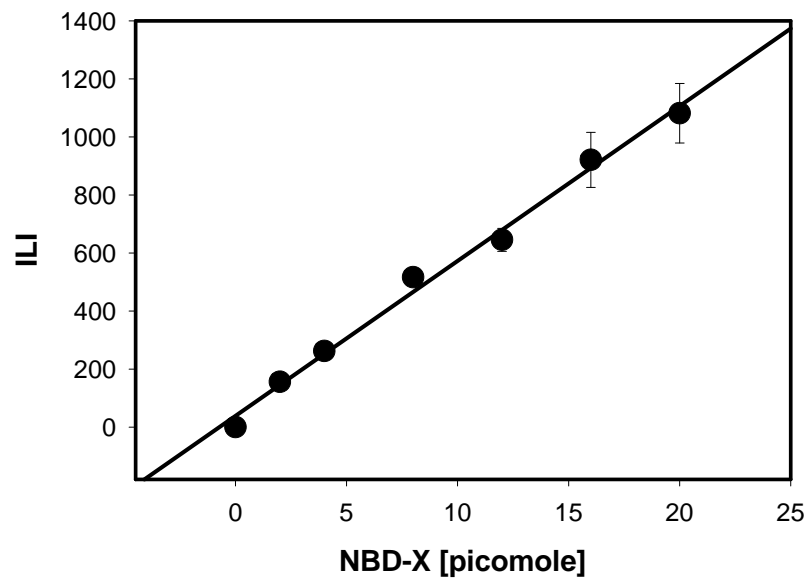
**Abb. 9** Spaltung des NBD-PCs durch die iPLA<sub>2</sub>

Die entstandenen Produktbanden konnten anschließend mit Hilfe eines UV-Transilluminators (360 nm Strahlungswellenlänge) sichtbar gemacht und über ein digitales Videosystem als TIF-Bild gespeichert werden. Dieses Bildformat zeichnet sich gegenüber anderen Formaten durch den größten Helligkeitstonumfang aus, was für die Genauigkeit der weiteren Quantifizierung wichtig ist. In Abbildung 10 ist eine UV-Photographie einer HPTLC-Platte abgebildet.



**Abb. 10** Dünnschichtchromatographie auf HPTLC-Platte

Die Berechnung der Enzymaktivitäten erfolgte unter Verwendung des BAY-Sys 1D Analyseprogramms, welches die photographierten fluoreszierenden Areale (spots) pixelweise in eine Grauwertscala umwandelte. Die erhaltenen Grauwerte wurden anschließend über eine vorher definierte Referenzlichtfläche (Spotarea) integriert, wodurch sich Werte ergaben, die die Lichtintensität des gesamten Spots, d. h. das „Lichtintegral“ der jeweiligen Produktbande, mit der Maßeinheit Integrierte Lichtintensität (ILI) beinhalteten. Aus den jeweils doppelten Werten für Liquor und Serum und den beiden Eichproben wurden die Mittelwerte errechnet. Nachfolgend erfolgte die Konvertierung der Lichtintensitäten in Produktkonzentrationen anhand der Eichwerte und der im Vorfeld der Untersuchung angefertigten Eichkurve, bei welcher die ILIs gegen die verwendeten Konzentrationen des NBD-X (in pmol) aufgetragen worden waren (vgl. Abbildung 11).



**Abb. 11** Eichkurve: integrierte Lichtintensität (ILI) zur Konzentration von NBD-X

Für die Eichkurve errechnete sich die Regressionsgerade  $y = 53,37 x + 38,98$  mit dem Variationskoeffizienten  $r^2 = 9,978$ . Die ermittelten Produktkonzentrationen wurden durch die jeweiligen Inkubationszeiten dividiert und anschließend auf den Proteingehalt und im Fall des Serums auf die Verdünnung im jeweiligen Ansatz normalisiert. Der Proteingehalt wurde nach der LOWRY-Methode bestimmt. Aus der Messung ergab sich letztlich eine Enzymaktivität in  $\text{pmol/min} \times \text{mg Protein}$ .

Die gesamte Methode ist für die Messung der Serumaktivitäten etabliert und wurde erfolgreich zur Untersuchung von  $\text{iPLA}_2$ -Veränderungen bei Schizophrenie eingesetzt (Smesny et al. 2005). Die Messung der  $\text{iPLA}_2$ -Aktivität im Liquor wurde erstmalig durchgeführt. Hierbei ergab sich die methodische Herausforderung, die für die Messung erforderliche Enzymaktivität durch erhöhte Konzentration des Liquors im Reaktionsansatz zu gewährleisten.

### 3.4 Differenzierung der iPLA<sub>2</sub>

NBD-PC wird von der Herstellerfirma als ein für die PLA<sub>2</sub> spezifisches Substrat angegeben. Dies wurde mittels der Erstellung von Inhibitorprofilen der gemessenen PLA<sub>2</sub>-Aktivität und der als Kontrolle dienenden Bienengift-PLA<sub>2</sub> unter Verwendung bekannter PLA<sub>2</sub> spezifischer Inhibitoren (4-bromo-phenacylbromide (BAB), aristolochic acid (ARISTO) und 4-(4-octadecylphenyl)-4-oxobutenoic acid (OBAA)) im Vorfeld der eigentlichen Messungen bestätigt. Es zeigte sich bei allen drei Inhibitoren eine effektive Hemmung der Enzymaktivität. Ergänzend wurden parallele Testmessungen mit Seren und einer vorher isolierten und angereicherten Probe der zu messenden iPLA<sub>2</sub> durchgeführt (Lasch et al. 2003).

Die weitere Charakterisierung der gemessenen PLA<sub>2</sub>-Aktivitäten erfolgte anhand ihrer Abhängigkeit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen. Dazu wurden die Reaktionsansätze von Serum und Liquor mit steigenden Mengen Kalzium versehen, wodurch es zu einer deutlichen Enzymhemmung kam, welche durch die Neutralisation des Kalziums mittels des Chelatbildners EGTA (Ethylenebis(oxyethylene-nitrilo)-tetraacetic Acid) reversibel war. Dieses Verhalten zeigte sich nicht bei der zum Vergleich mitgeführten Bienengift-PLA<sub>2</sub>. Die genaue Versuchsanordnung und die Ergebnisse sind den Tabellen 5 und 6 zu entnehmen.

**Tab. 5** Einfluss von Ca<sup>2+</sup> und EGTA auf die PLA<sub>2</sub>-Aktivität modifiziert nach Lasch et al. 2003

Zusatz	PLA <sub>2</sub> -Aktivität (Serum)		PLA <sub>2</sub> -Aktivität (Bienengift)	
	RFU/min	Aktivität in %	RFU/min	Aktivität in %
<b>ohne Zusatz</b>	163	100	111,5	100
<b>1 mM Ca<sup>2+</sup></b>	38,5	23,6	-	-
<b>2 mM Ca<sup>2+</sup></b>	17,7	10,8	163,5	146,6
<b>5 mM Ca<sup>2+</sup></b>	12,3	7,5	-	-
<b>5 mM EGTA</b>	143,9	88,3	0,5	0,4

RFU/min = relative fluorescence unite per minute, mM = Millimolar, Ca<sup>2+</sup> = Kalzium,  
EGTA = Ethylene-bis(oxyethylene-nitrilo)-tetraacetic Acid

**Tab. 6** Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  und EGTA auf die  $\text{PLA}_2$ -Aktivität (Liquor)

<b>Zusatz</b>	<b><math>\text{PLA}_2</math>-Aktivität (Liquor)</b>	
	<b>RFU/min</b>	<b>Aktivität in %</b>
<b>ohne Zusatz</b>	55,4	100
<b>1 mM <math>\text{Ca}^{2+}</math></b>	19,7	35,6
<b>2 mM <math>\text{Ca}^{2+}</math></b>	17,0	30,7
<b>5 mM <math>\text{Ca}^{2+}</math></b>	6,5	11,8
<b>5 mM <math>\text{Ca}^{2+}</math> + 10 mM EGTA</b>	7,4	13,3
<b>5 mM <math>\text{Ca}^{2+}</math> (5 min) + 10 mM EGTA (5 min)*</b>	38,6	69,6

RFU/min = relative fluorescence unite per minute, mM = Millimolar,  $\text{Ca}^{2+}$  = Kalzium,

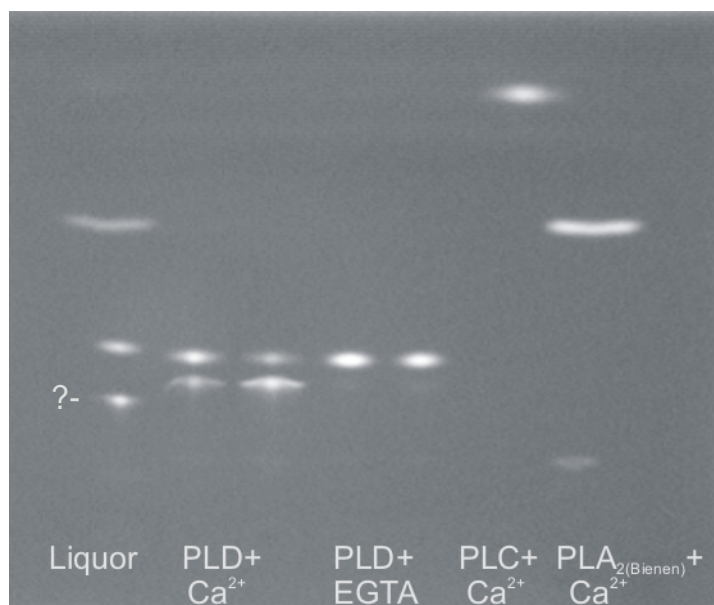
EGTA = Ethylene-bis(oxyethylene-nitrilo)-tetraacetic Acid

\*5min mit  $\text{Ca}^{2+}$  vorinkubiert, Zusatz EGTA und 5 min erneute Inkubation, dann Substratzugabe

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich im Gegensatz zur klassischen kalzium-abhängigen  $\text{PLA}_2$  Typ I, wie sie beispielsweise im Bienengift vorkommt, bei den in dieser Studie gemessenen  $\text{PLA}_2$ -Aktivitäten um kalziumunabhängige (i $\text{PLA}_2$ ) handelt. Unterstützt wird diese Erkenntnis dadurch, dass es durch den i $\text{PLA}_2$  spezifischen Inhibitor Bromoenol Lacton (BEL) zu einer fast vollständigen Hemmung der mit der NBD-Methode gemessenen  $\text{PLA}_2$ -Aktivität kam.

Das gleiche Verhalten von Serum- und Liquor- $\text{PLA}_2$  legt nahe, dass es sich bei den fluorometrisch messbaren  $\text{PLA}_2$ -Aktivitäten um zumindest in ihren katalytischen Eigenschaften identische Enzyme handelt, wobei die Aktivität im Liquor regelhaft geringer ausgeprägt ist als diejenige im Serum. Zur genauen Identifikation der gemessenen Phospholipaseaktivitäten wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, die im folgenden Kapitel dargestellt sind.

Zusätzlich zu der NBD-X-Bande zeigten sich, wie bereits in Abbildung 10 ersichtlich, bei der chromatographischen Auftrennung der Produkte des NBD-PCs im Liquor weitere fluoreszierende Produkte, was auf die Existenz wenigstens eines weiteren NBD-PC-hydrolysierenden Enzyms hindeutet. Die Untersuchungen zur Identifizierung dieser zusätzlichen Phospholipase-Aktivität im Liquor zeigten, dass die Hydrolyse von NBD-PC bei allen Referenzenzymen nur in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen möglich war. Ohne Kalzium (in Gegenwart adäquater Konzentrationen an EGTA) erfolgte keine Hydrolyse. Durch einen Vergleich der Spaltprodukte (vgl. Abbildung 12) ergab sich kein Hinweis für eine PLC- oder PLD-Aktivität im Liquor.



**Abb. 12** Phospholipaseaktivität im Liquor bei Verwendung des Substrates NBD-PC  
 PLC/ D = Phospholipase C/ D, EGTA = Ethylenbis(oxyethylene-nitrilo)tetraessigsäure

Obwohl die genaue Identität der zusätzlichen Phospholipase-Aktivität bis heute noch nicht geklärt werden konnte, ist durch die chromatographische Auftrennung der Produkte und die gezielte Messung der Lichtintensitäten der einzelnen Banden davon auszugehen, dass die beschriebene NBD-Methode eine ausreichende Empfindlichkeit zur Untersuchung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in Serum und Liquor aufweist.

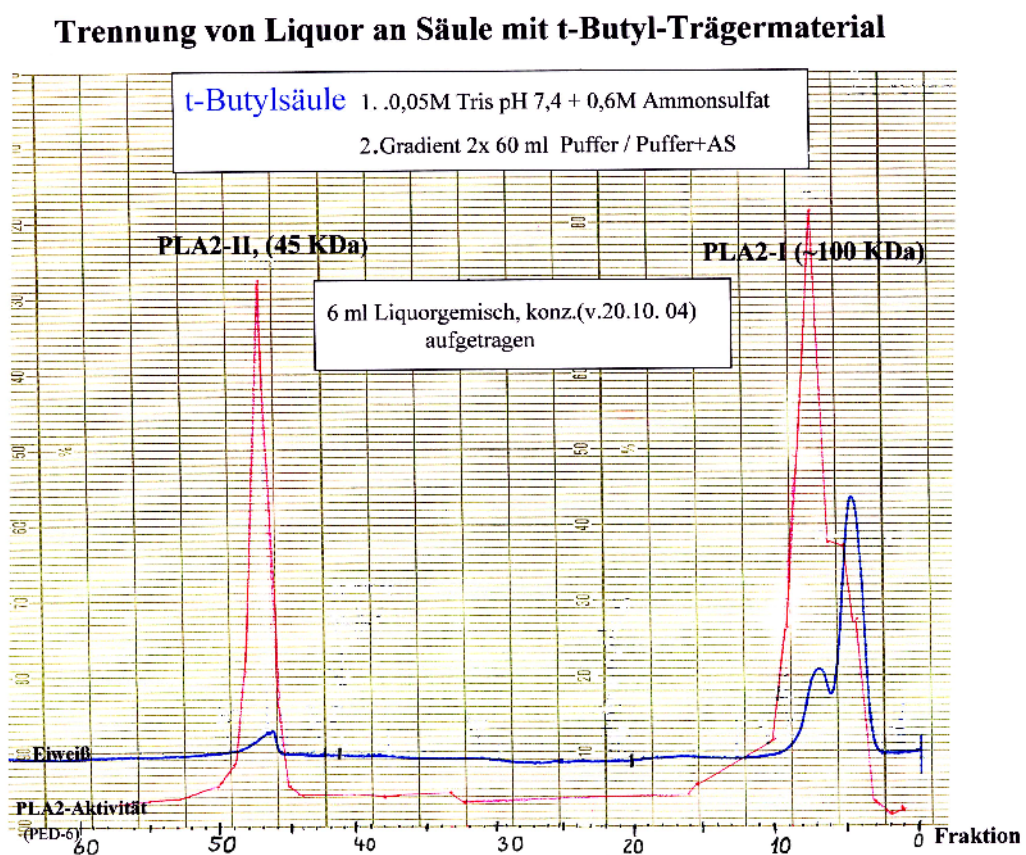


### 3.5 Identifikation der iPLA<sub>2</sub> in Serum und Liquor

Der Nachweis der iPLA<sub>2</sub> in Serum und Liquor als das gleiche Enzym wurde durch Dr. Willhardt vom Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle im Rahmen bestehender Kooperationsprojekte mit unserer Arbeitsgruppe erbracht. Die dargestellten Ergebnisse zur Methodik werden gemeinsam mit den klinischen Ergebnissen dieser Studie publiziert.

Die Übereinstimmung der iPLA<sub>2</sub> in Serum und Liquor konnte mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers bestätigt werden. Mittels gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine humanen Serums wurde eine Proteinbande mit einer Molmasse von circa 45 kDa identifiziert, die in diesem Spektrum die höchste PLA<sub>2</sub>-Aktivität gegenüber dem fluorogenen Substrat NBD-PC aufwies. Dieses PLA<sub>2</sub>-aktive Protein wurde zur Gewinnung eines Standards sowie als Antigen für die Generierung des polyklonalen Antikörpers in Kaninchen zur Erarbeitung eines ELISAs hochgereinigt. Dies gelang durch zwei aufeinanderfolgende Säulentechniken (Hydrophobic Interaction Chromatographie und Ionenaustauschchromatographie) und eine anschließende präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

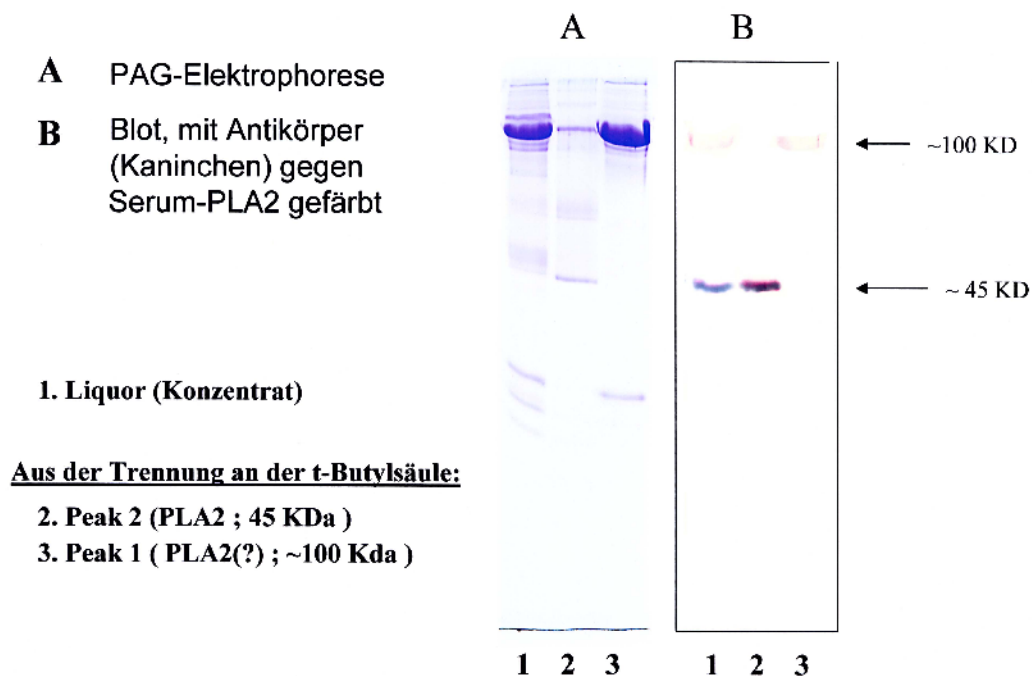
Zur Identifikation der PLA<sub>2</sub> wurden zunächst 6 ml Liquor, welcher durch Druckdialyse auf ein Zehntel seines Volumens konzentriert wurde, an einer Säule mit t-Butylmatrix (Hydrophobic Interaction Chromatography) mit Hilfe eines fallenden linearen Ammoniumsulfat-Gradientens getrennt. Dabei entstanden im Wesentlichen drei Proteinpeaks (Fraktion 4, 7 und 47) von denen zwei (Fraktion 7 und 47) PLA<sub>2</sub>-Aktivität gegenüber dem fluorogenen Substrat (PED<sub>6</sub><sup>®</sup>) aufwiesen. Das Protein des aktiven Peaks 7 hat eine Molmasse von ca. 100 kDa, das des aktiven Peaks 47 von 45 kDa. Dieser Arbeitsschritt ist in der Abbildung 13 dargestellt.



**Abb. 13** Auftrennung des konzentrierten Liquores

AS = Ammonsulfat, konz. = konzentriert, v. = vom

Anschließend wurde eine analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli 1970) der Fraktion 7 (Peak 1, Bahn 3) und der Fraktion 47 (Peak 2, Bahn 2) der Säulentrennung sowie des konzentrierten Ausgangsliquors (Bahn 1) durchgeführt (vgl. Abbildung 14). Dabei wurde unter A eine Färbung mit Coomassiebrilliant-blue durchgeführt und unter B ein Blot von A auf Nitrozellulosefolie, auf der die PLA<sub>2</sub>-Proteine mit Hilfe des entwickelten polyklonalen Antikörpers sichtbar gemacht wurden. Dabei ist zu erkennen, dass der mit Hilfe von Serum gewonnene Antikörper auch im Liquor ein PLA<sub>2</sub> aktives Protein mit der Molmasse 45 kDa deutlich markiert, während das Protein mit der Molmasse von 100 kDa nur eine schwache Anfärbung zeigt.

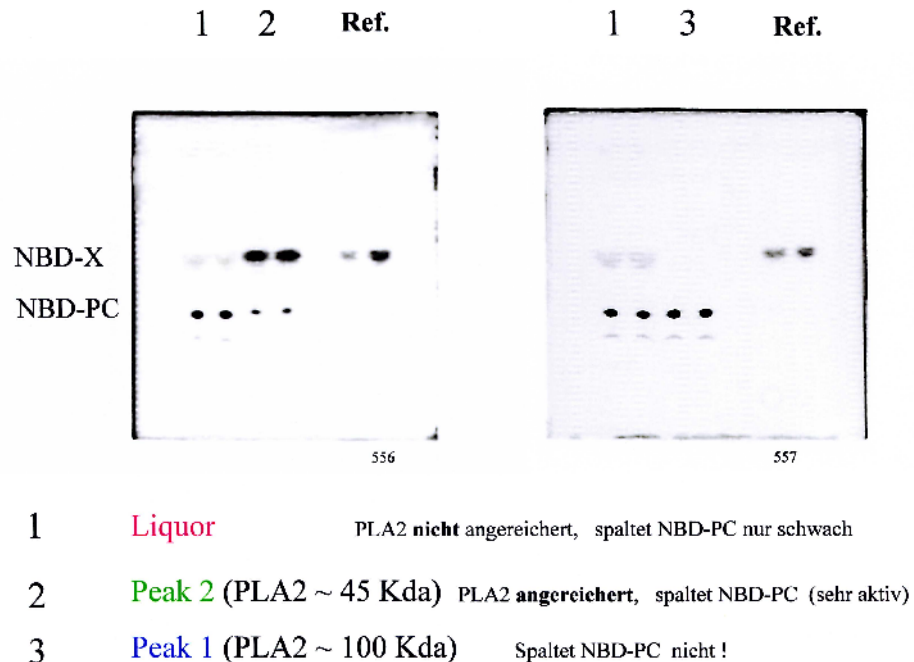


**Abb. 14** Gelelektrophorese Fraktion 7 (Peak 1, Bahn 3), Fraktion 47 (Peak 2, Bahn 2) und des konzentrierten Liquors (Bahn 1)

PAG = Polyacrylamid

Die Abbildung 15 beschreibt die PLA<sub>2</sub>-Aktivität der Fraktionen der Säulentrennung. Dabei wurde die Hydrolyse von NBD-PC auf HPTLC-Platten gemessen. Die Abbildungen zeigen die unterschiedliche Intensität der Produktbildung (NBD-X) als Schwärzungen, da es sich um eine inverse Fluoreszenz-Aufnahme handelt. Auf der Platte 556 zeigt Bahn 1 geringe aber sichtbare Aktivität einer Liquorprobe (Bildung von NBD-X). Bahn 2 zeigt die Enzymprobe aus Peak 2 mit der Molmasse 45 kDa, welche eine angereicherte PLA<sub>2</sub>-Aktivität besitzt. Entsprechend ist eine intensive Bildung von NBD-X und eine deutliche Abnahme des Substrats erkennbar. Die Referenzbahn zeigt das Produkt in zwei unterschiedlichen Konzentrationen. Auf der Platte 557 ist zum Vergleich noch einmal Bahn 1 dargestellt. Der Spaltansatz von Bahn 3 enthält eine Enzymprobe des 100 kDa-Enzyms in etwa gleicher Proteinmenge wie in Peak 1. Hier ist keine Spaltung des Substrates NBD-PC feststellbar, so dass eine Identität mit der PLA<sub>2</sub> von 45 kDa auch auf diesem Weg ausgeschlossen werden kann.

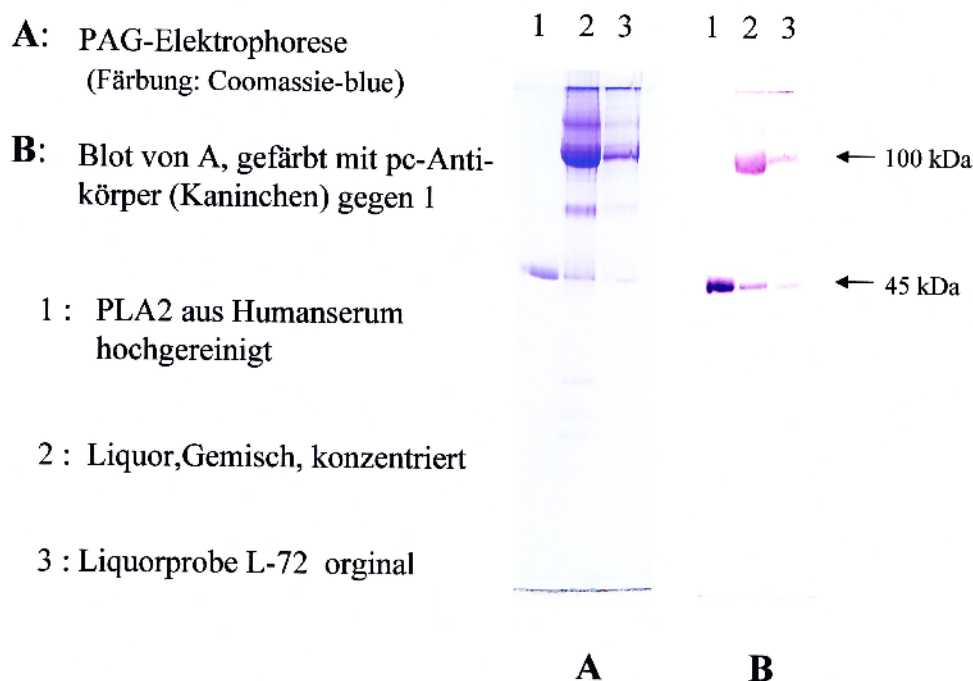
#### PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Liquor mit NBD-PC als Substrat (HPTLC-Platte)



**Abb. 15** PLA<sub>2</sub>-Aktivität der Fraktionen der Säulentrennung

Ref. = Referenzbahn

In Abbildung 16 wird unter A die elektrophoretische Übereinstimmung der PLA<sub>2</sub> aus dem Serum (Bahn 1) mit der im Liquor enthaltenen PLA<sub>2</sub> (Bahn 2, konzentrierter Liquor) dargestellt. Auch in der nicht konzentrierten Original-Liquorprobe (Bahn 3) ist die 45 kDa-Proteinbande noch sichtbar. Unter B wird A wiederum als Blot auf Nitrozellulosefolie gezeigt, angefärbt unter Verwendung des generierten Antikörpers gegen die PLA<sub>2</sub> (45 kDa). Bahn 1 zeigt Humanserum, Bahn 2 konzentrierten und Bahn 3 nicht konzentrierten Liquor. Dabei wird auch in Bahn 2 und 3 die 45 kDa-Bande angefärbt. In geringem Maße zeigt auch die 100 kDa-Bande eine Anfärbung, was für das Vorhandensein vergleichbarer determinanter Gruppen an diesem Protein spricht. Da ebenfalls eine Spaltung des Substrates (PED<sub>6</sub><sup>®</sup>) beobachtet wurde, wie in Abbildung 13 ersichtlich ist, könnte hier eine weitere PLA<sub>2</sub>-Aktivität anderer Spezifität vorliegen.



**Abb. 16** Elektrophoretische Übereinstimmung Serum-PLA<sub>2</sub> (Bahn 1) mit Liquor-PLA<sub>2</sub> (Bahn 2)  
PAG = Polyacrylamid

### 3.6 Bearbeitung der Messdaten

Die statistische Analyse der Daten erfolgte unter Verwendung des Statistiksoftwareprogramms SPSS 11.5.

In einer Voruntersuchung wurde zunächst der Verteilungstyp der gemessenen Liquor- und Serumwerte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest auf Normalverteilung überprüft (Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ ).

Um einen Überblick über generelle Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen zu gewinnen, kam eine Univariate Varianzanalyse (ANOVA) zur Anwendung. Mit dieser können Effekte zwischen einer abhängigen Variable und einem oder mehreren Faktoren untersucht werden. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Dieser Test fand weiterhin bei der Untersuchung von Geschlechtereffekten auf die PLA<sub>2</sub>-Aktivität Anwendung. Außerdem wurde der Einfluss von ASS 100 mg/d als häufigste Medikation und von Acetylcholinesterasehemmern auf diese Weise geprüft. Im weiteren Vorgehen kam der Levene-Test auf Homogenität der Varianzen zur Anwendung (Signifikanzniveau  $\alpha = 0,1$ ), um bei gleichen Varianzen mit dem Zweistichproben-t-Test und bei ungleichen Varianzen mit dem Welch-Test, einer robustifizierten Version des t-Tests, die ermittelten PLA<sub>2</sub>-Werte der verschiedenen Gruppen auf signifikante Unterschiede zu überprüfen. In beiden Tests werden die Mittelwerte von zwei Fallgruppen verglichen. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 0,05$  verwendet.

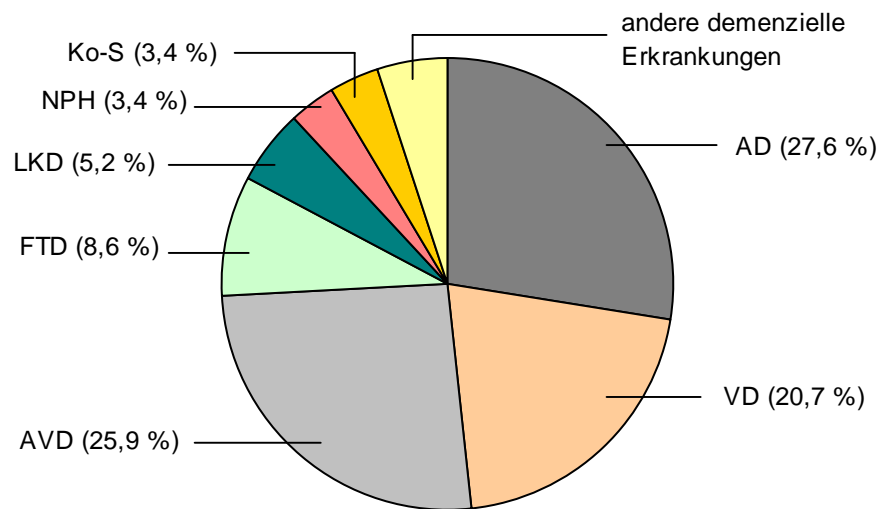
Wenn die Anzahl der in die Berechnungen eingehenden Werte sehr klein war, wurden die oben genannten Tests nicht angewandt, sondern eine beschreibende Analyse mittels Boxplots durchgeführt, um aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten. Als Streuungsmaße dienen hier die Spannweite, welche den gesamten Bereich zwischen Maximal- und Minimalwert angibt (100 % aller Werte) und der Stichprobenquartilabstand, in welchem alle Werte zwischen dem 0,25-Quantil und dem 0,75-Quantil liegen (50 % aller Werte).

Um zum einen den eventuellen Einfluss des Alters auf die Aktivität der PLA<sub>2</sub> darzustellen und zum anderen auf einen Zusammenhang zwischen den PLA<sub>2</sub>-Werten in Liquor und Serum zu untersuchen, wurden Korrelationen gerechnet. Da die eventuell zu erwartenden Zusammenhänge linear wären, wurde die Lineare Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt. Der beobachtete lineare Zusammenhang ist dabei schwach, wenn der Betrag des Stichproben-Maßkorrelationskoeffizients ( $r$ ) zwischen 0 und 0,3 liegt, mittel, wenn er zwischen 0,3 und 0,7 liegt und stark, wenn er zwischen 0,7 und 1 liegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Epidemiologische Betrachtung der Stichprobe

In der untersuchten Patientengruppe machen die AD-Patienten mit 27,6 % den größten Anteil aus. Die Patienten mit AVD bilden 25,9 % und diejenigen mit VD 20,7 % der Patienten. Eine genaue Betrachtung des gesamten Patientenspektrums ist Abbildung 17 zu entnehmen.



**Abb. 17** prozentualer Anteil der einzelnen demenziellen Erkrankungen am Gesamtspektrum

AD = Alzheimer Demenz, VD = Vaskuläre Demenz, AVD = Mischtyp aus AD und VD,  
 FTD = Frontotemporale Demenz, LKD = Lewy-Körper-Demenz,  
 NPH = Normaldruckhydrozephalus, Ko-S = Korsakow-Syndrom

Der Anteil der Frauen an der Gruppe der Patienten ist mit 44 % insgesamt geringer als derjenige der Männer. An der Gruppe der Patienten mit AD haben sie einen Anteil von 44 %, an der der Patienten mit VD 50 % und an der der Patienten mit AVD 47 %.

## 4.2 Untersuchungen zu den drei Hauptdemenzformen (AD, VD, AVD)

### 4.2.1 Gruppenvergleiche der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität

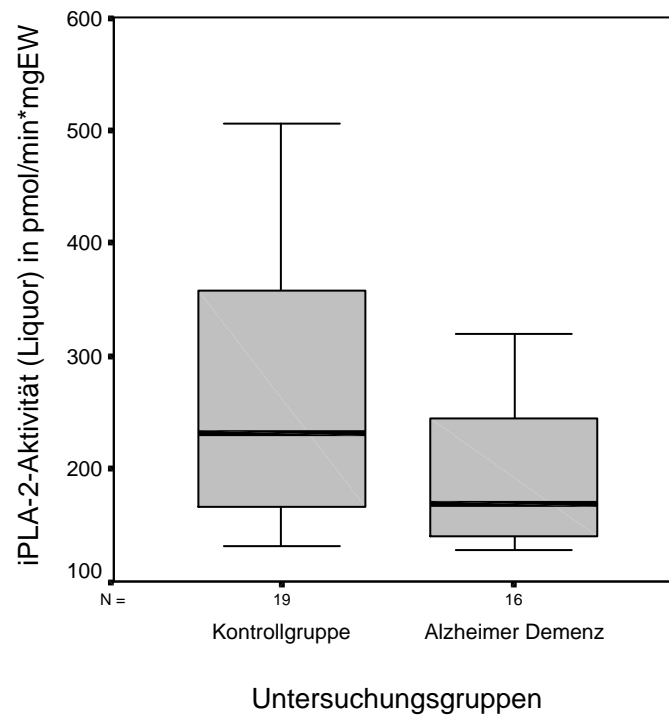
Die initiale univariate ANOVA konnte generelle Gruppeneffekte zwischen der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor bei Kontrollgruppe, Patientengruppe mit Alzheimer Demenz, Vaskulärer Demenz und Demenz vom Mischtyp aufdecken ( $F_{3; 61} = 3,399$ ;  $p = 0,024$ ), d. h. dass die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor in Abhängigkeit von der Gruppe Unterschiede aufweist.

Für die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> im Serum ergaben sich zwar keine Gruppeneffekte ( $F_{3; 38} = 0,329$ ;  $p = 0,805$ ), um aber etwaige tendenzielle Unterschiede nicht zu übersehen, wurde auch für die Serumwerte eine weiterführende Analyse durchgeführt.



Alzheimer Demenz

Post-hoc Untersuchungen der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor ergaben im Welch-Test signifikant niedrigere Werte bei Patienten mit Alzheimer Demenz im Vergleich mit der Kontrollgruppe ( $t_{27; 0,975} = 2,332$ ;  $p = 0,027$ ). Dies ist in Abbildung 18 dargestellt.



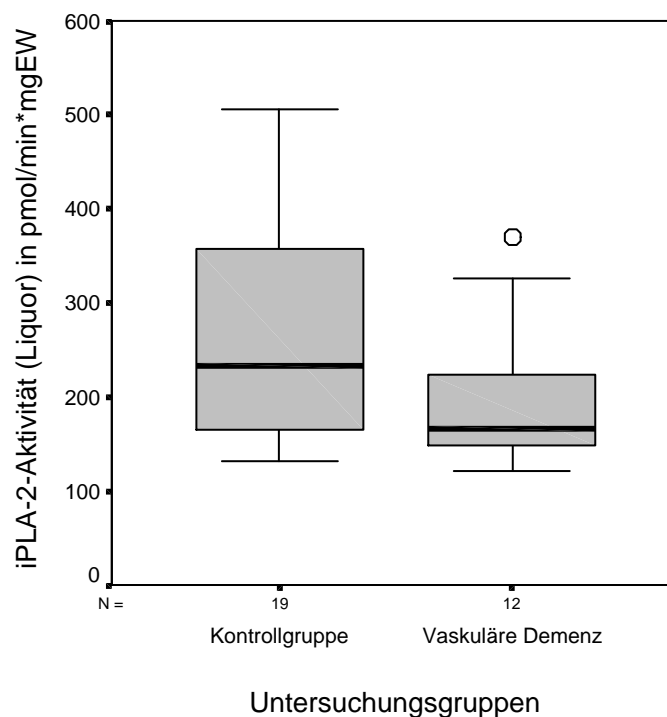
**Abb. 18** iPLA<sub>2</sub>-Aktivität (Liquor) Alzheimer Demenz vs. Kontrollgruppe

pmol = picomol, EW = Eiweiß, \* = mal, n = Anzahl

Bei dem Vergleich der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Serum zwischen Patienten mit Alzheimer-Demenz und der Kontrollgruppe ergab sich im Welch-Test kein signifikanter Unterschied ( $t_{11; 0,975} = 0,022$ ;  $p = 0,983$ ).

### Vaskuläre Demenz

Im Vergleich der Patientengruppe mit Vaskulärer Demenz und der Kontrollgruppe mittels Welch-Test konnte kein signifikanter Unterschied der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor nachgewiesen werden ( $t_{28; 0,975} = 2,012$ ;  $p = 0,054$ ). Ein tendenzieller Unterschied bezüglich einer verminderten Aktivität der iPLA<sub>2</sub> wird in Abbildung 19 sichtbar. Bezieht man den Patienten mit dem ausreißenden Wert nicht in die Berechnung des Welch-Tests mit ein, ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ( $t_{27; 0,975} = 2,67$ ;  $p = 0,013$ ).

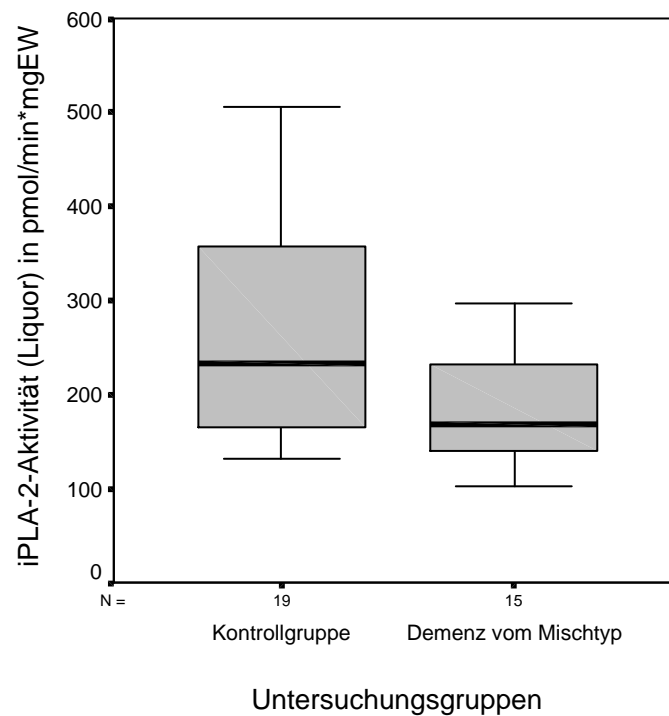


**Abb. 19** iPLA<sub>2</sub>-Aktivität (Liquor) Vaskuläre Demenz vs. Kontrollgruppe

Bei dem Vergleich der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Serum zwischen beiden Gruppen mittels t-Test ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $t_{14; 0,975} = -0,846$ ;  $p = 0,412$ ).

### Demenz vom Mischtyp Alzheimer Demenz und Vaskuläre Demenz

Bei dem Vergleich der Demenz vom Mischtyp aus Alzheimer Demenz und Vaskulärer Demenz mit der Kontrollgruppe mittels Welch-Test ergab sich ein signifikanter Unterschied. Die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> im Liquor ist in der Patientengruppe signifikant niedriger ( $t_{27; 0,975} = 2,575$ ;  $p = 0,016$ ). Dies wird in Abbildung 20 verdeutlicht.

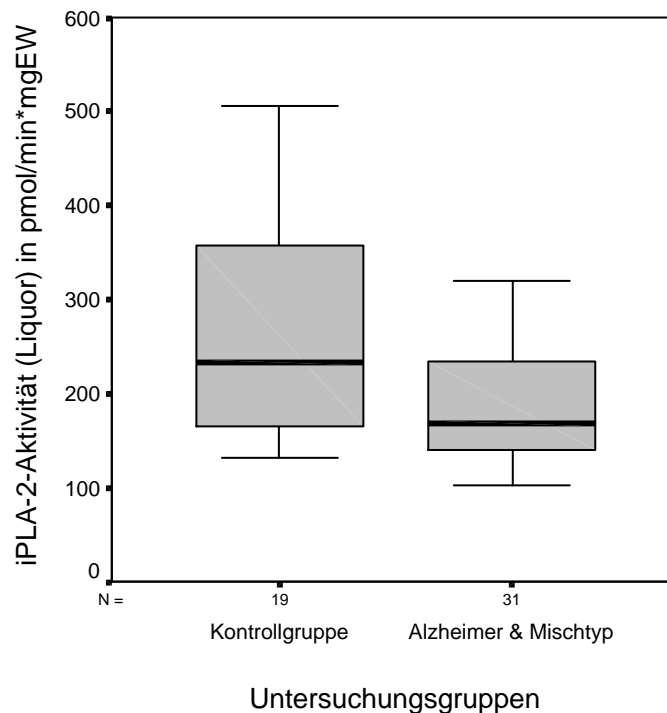


**Abb. 20** iPLA<sub>2</sub>-Aktivität (Liquor) Demenz vom Mischtyp vs. Kontrollgruppe

Im Vergleich der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Serum zwischen beiden Gruppen mittels t-Test ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $t_{22; 0,975} = -0,971$ ;  $p = 0,342$ ).

### Alzheimer Demenz und Demenz vom Mischtyp in einer Gruppe

Auch in dem Vergleich der in einer Gruppe zusammengefassten Alzheimer Demenz und der Demenz vom Mischtyp mit der Kontrollgruppe hinsichtlich der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor ergab sich ein signifikanter Unterschied im Welch-Test hinsichtlich einer verminderten Aktivität der iPLA<sub>2</sub> in der Patientengruppe ( $t_{23; 0,975} = 2,620$ ;  $p = 0,015$ ). Zur Verdeutlichung siehe Abbildung 21.

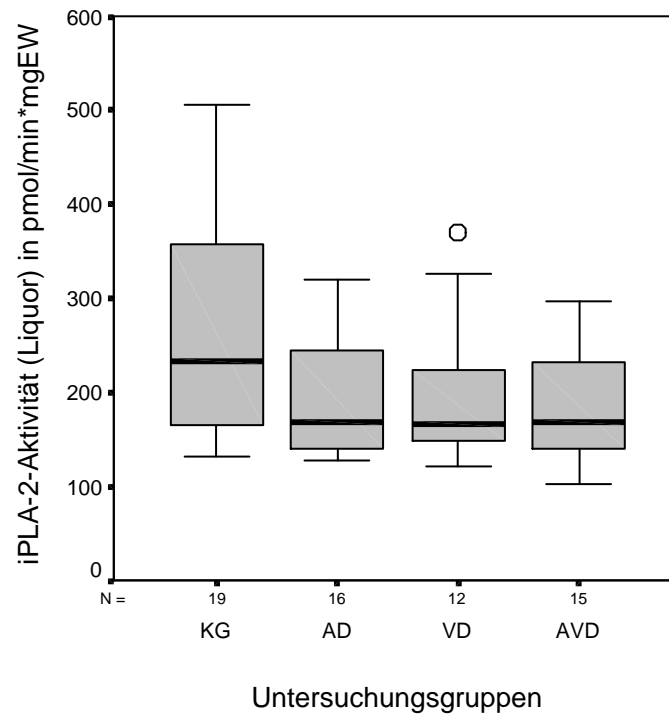


**Abb. 21** iPLA<sub>2</sub>-Aktivität (Liquor) Alzheimer Demenz und Demenz vom Mischtyp vs. Kontrollgruppe

Der Vergleich der Gruppen hinsichtlich der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Serum mittels Welch-Test ergab erwartungsgemäß keinen signifikanten Unterschied ( $t_{31; 0,975} = -0,584$ ;  $p = 0,563$ ).

### Teilzusammenfassung

In der nachfolgenden Darstellung (vgl. Abbildung 22) sind die bis hierher untersuchten Demenzformen ergänzend im Zusammenhang dargestellt.

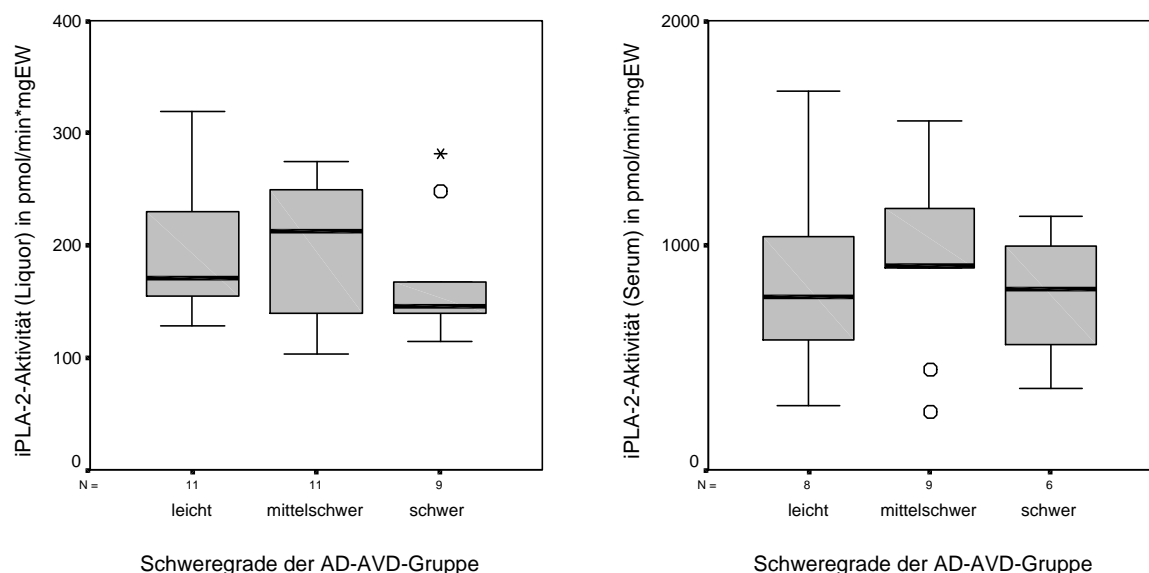


**Abb. 22** Teilzusammenfassung: iPLA<sub>2</sub>-Aktivität (Liquor) der Hauptdemenzformen vs. Kontrollgruppe  
 KG = Kontrollgruppe, AD = Alzheimer Demenz, VD = Vaskuläre Demenz, AVD = Mischtyp aus AD/ VD

#### 4.2.2 Einfluss des Schweregrades der Erkrankung auf die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität

Um eine aussagekräftige Gruppengröße zu bekommen, wurden für diese Analyse die Gruppe der Alzheimer Demenz und die Gruppe der Demenz vom Mischtyp aus Alzheimer und Vaskulärer Demenz zusammengelegt. Der t-Test ergab im Vergleich der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor zwischen leichter und mittelschwerer ( $t_{20; 0,975} = 0,182$ ;  $p = 0,857$ ), sowie zwischen mittelschwerer und schwerer ( $t_{18; 0,975} = 0,918$ ;  $p = 0,371$ ) als auch zwischen leichter und schwerer ( $t_{18; 0,975} = 1,076$ ;  $p = 0,296$ ) Ausprägung der Erkrankungen keine signifikanten Unterschiede. Eine Tendenz zu geringeren Werten in der Gruppe der Patienten mit schwerer Krankheitsausprägung im Vergleich zu den übrigen Patienten wird aus Abbildung 23 deutlich. Da hier zwei Patienten deutlich aus der Gruppe herausfallen, wurde der t-Test ohne diese Patienten wiederholt. Hierbei ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen mittelschwerer und schwerer ( $t_{16; 0,975} = 2,126$ ;  $p = 0,049$ ) sowie zwischen leichter und schwerer Ausprägung der Demenz ( $t_{16; 0,975} = 2,243$ ;  $p = 0,039$ ).

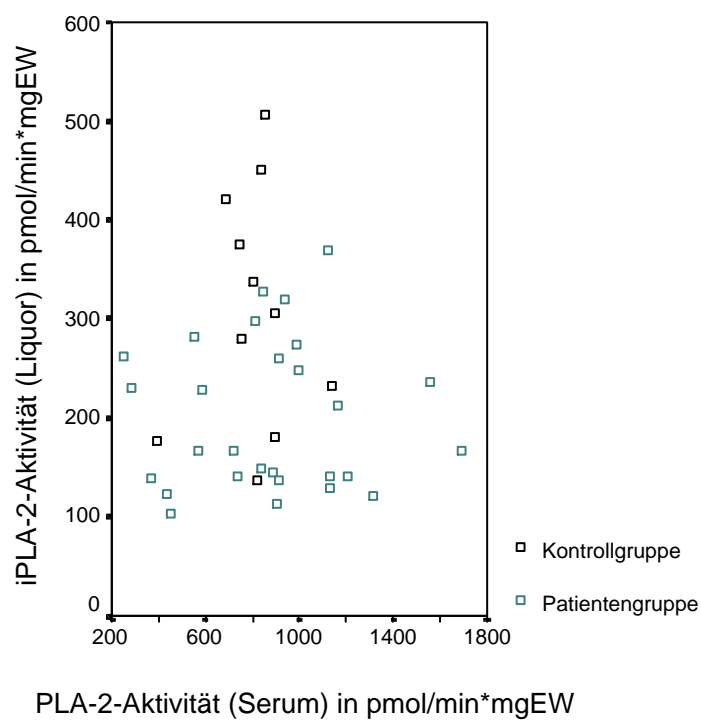
Bei dem Vergleich der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Serum mittels t-Test ergaben sich zwischen leichter und mittelschwerer ( $t_{15; 0,975} = -0,415$ ;  $p = 0,684$ ), zwischen mittelschwerer und schwerer ( $t_{13; 0,975} = 0,815$ ;  $p = 0,429$ ) sowie zwischen leichter und schwerer Ausprägung ( $t_{12; 0,975} = 0,344$ ;  $p = 0,737$ ) keine signifikanten Unterschiede im t-Test. Hier zeichnen sich auch in der graphischen Darstellung keine wesentlichen Unterschiede ab (vgl. Abbildung 23).



**Abb. 23** iPLA<sub>2</sub>-Aktivität (Liquor/ Serum) nach Schweregrad der AD-AVD-Gruppe

#### 4.2.3 Zusammenhang zwischen der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in Serum und Liquor

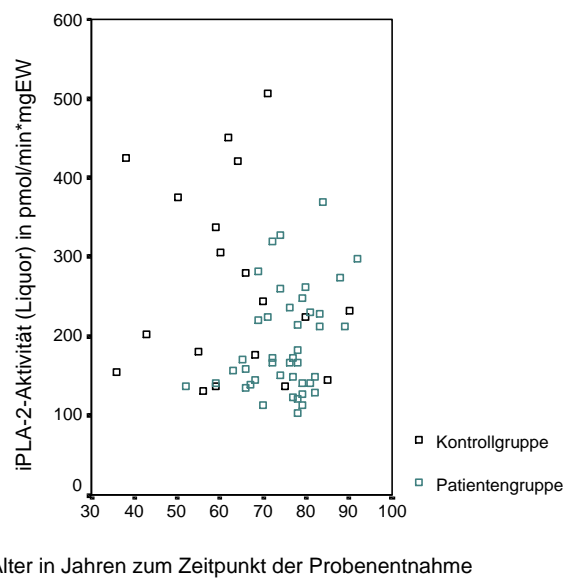
Es besteht weder eine signifikante lineare Korrelation zwischen den Werten der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in Liquor und Serum unter der Analyse aller Probanden ( $r = 0,112$ ;  $p = 0,415$ ), noch unter ausschließlichem Einbezug der Kontrollgruppe ( $r = 0,054$ ;  $p = 0,875$ ). Um andere Zusammenhänge nicht zu übersehen, wurde zusätzlich ein Scatterplot (Abbildung 24) angefertigt.



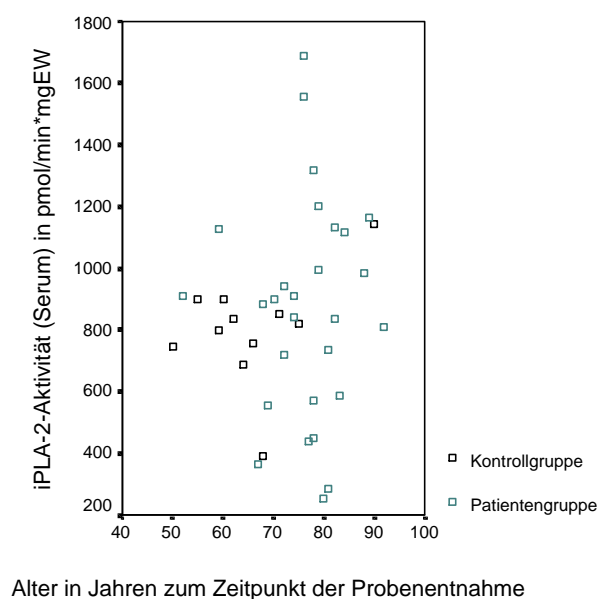
**Abb. 24** Scatterplot zur Korrelationsanalyse zwischen den iPLA<sub>2</sub>-Aktivitäten in Liquor und Serum

#### 4.2.4 Alter und iPLA<sub>2</sub>-Aktivität

Es besteht keine signifikante lineare Korrelation zwischen dem Alter der Probanden und der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor ( $r = -0,44$ ;  $p = 0,7$ ) bzw. der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Serum ( $r = 0,196$ ;  $p = 0,084$ ). Auch bei der Analyse der Kontrollgruppe allein findet sich weder eine lineare Korrelation des Alters mit der Aktivität der iPLA<sub>2</sub> im Liquor ( $r = -0,13$ ;  $p = 0,6$ ) noch mit derjenigen im Serum ( $r = 0,37$ ;  $p = 0,3$ ). Wie aus den Abbildungen 25 und 26 zu entnehmen ist, sind auch andere Zusammenhänge nicht zu erkennen.



**Abb. 25** Scatterplot zur Korrelationsanalyse zwischen iPLA<sub>2</sub>-Aktivität (Liquor) und Patientenalter



**Abb. 26** Scatterplot zur Korrelationsanalyse zwischen iPLA<sub>2</sub>-Aktivität (Serum) und Patientenalter



#### 4.2.5 Geschlechtsbedingte Unterschiede

Bei der Untersuchung des Einflusses des Geschlechts auf die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> im Liquor mit Hilfe der Univariaten Varianzanalyse ergab sich keine signifikante Wechselwirkung zwischen dem Geschlecht und der Untersuchungsgruppe ( $F_{3; 61} = 0,564$ ;  $p = 0,641$ ) und kein signifikanter Effekt des Geschlechts auf die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> im Liquor ( $F_{1; 61} = 3,315$ ;  $p = 0,074$ ). Für die Untersuchungen im Serum ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Wechselwirkungen zwischen Geschlecht und Untersuchungsgruppe ( $F_{3; 38} = 0,2$ ;  $p = 0,895$ ) sowie keine signifikanten Effekte des Geschlechts auf die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität ( $F_{1; 38} = 0,158$ ;  $p = 0,694$ ).

#### 4.2.6 Einfluss von Medikamenten auf die Aktivität der iPLA<sub>2</sub>

##### ASS 100

Der Einfluss der Einnahme von ASS (100 mg/d) wurde ebenfalls mit der Univariaten Varianzanalyse ermittelt. Bezüglich der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen Medikamenteneinnahme und Diagnose ( $F_{3; 43} = 2,18$ ;  $p = 0,107$ ) und kein signifikanter Effekt der Medikamenteneinnahme auf die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität ( $F_{1; 43} = 1,526$ ;  $p = 0,225$ ). In gleicher Weise ergab sich bezüglich der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Serum kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Medikamenteneinnahme und den jeweiligen Untersuchungsgruppen ( $F_{1; 22} = 1,37$ ;  $p = 0,258$ ) und kein signifikanter Effekt der Medikamenteneinnahme auf die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> ( $F_{1; 22} = 0,99$ ;  $p = 0,334$ ).

##### Acetylcholinesterasehemmer

Die Einnahme von Acetylcholinesterasehemmern stand sowohl bei der Untersuchung im Liquor ( $F_{2; 61} = 1,695$ ;  $p = 0,193$ ) als auch bei der Untersuchung im Serum ( $F_{2; 38} = 0,31$ ;  $p = 0,735$ ) in keinem signifikanten Zusammenhang zu den einzelnen Untersuchungsgruppen und ergab ebenfalls keine signifikante Beeinflussung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in Liquor ( $F_{1; 61} = 0,361$ ;  $p = 0,55$ ) und Serum ( $F_{1; 38} = 0,474$ ;  $p = 0,496$ ).

### 4.3 Gruppen- und Einzelvergleiche der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität bei weiteren Demenzformen

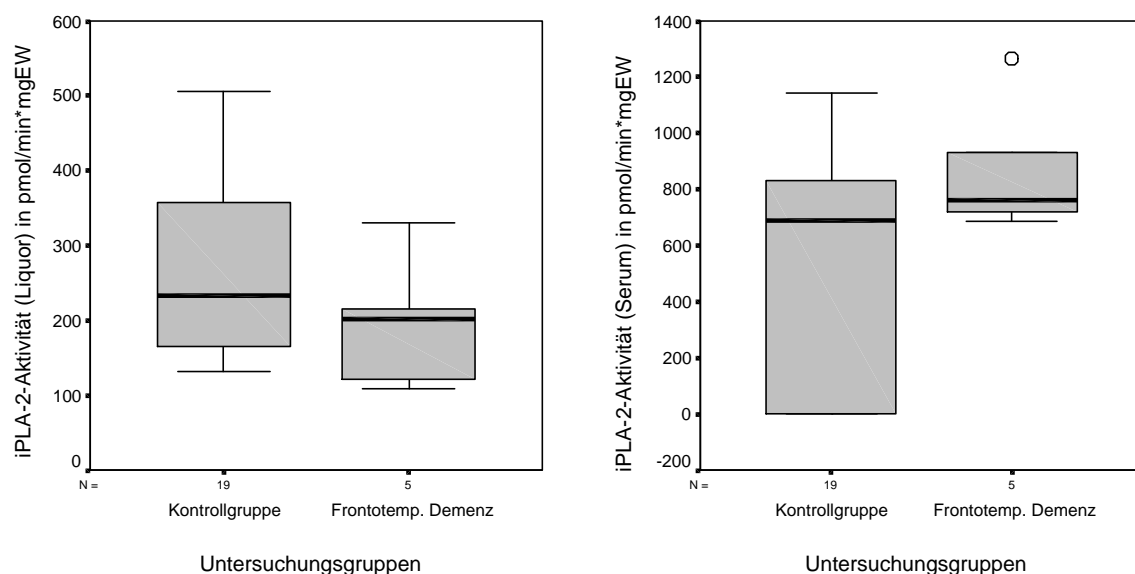
Die in diesem Kapitel folgenden Auswertungen sind als rein explorativ anzusehen, um eventuelle Ansätze für weiterführende Untersuchungen offenzulegen.

Die ermittelten Werte der folgenden Patientengruppen wurden mit Ausnahme derjenigen mit FTD aufgrund der kleinen Gruppengrößen einzeln mit denjenigen der Kontrollgruppe verglichen.

#### Frontotemporale Demenz

Im Vergleich der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor von Patienten mit Frontotemporaler Demenz und der Kontrollgruppe ergab sich kein signifikanter Unterschied im t-Test ( $t_{22; 0,975} = 1,232$ ;  $p = 0,231$ ). Da der Stichprobenumfang hier mit fünf Patienten sehr klein ist, erfolgte zusätzlich die graphische Darstellung, um tendenzielle Unterschiede sichtbar zu machen (vgl. Abbildung 27). In der graphischen Boxplotdarstellung liegt die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> im Liquor bei Patienten mit Frontotemporaler Demenz tendenziell unter der der Kontrollgruppe.

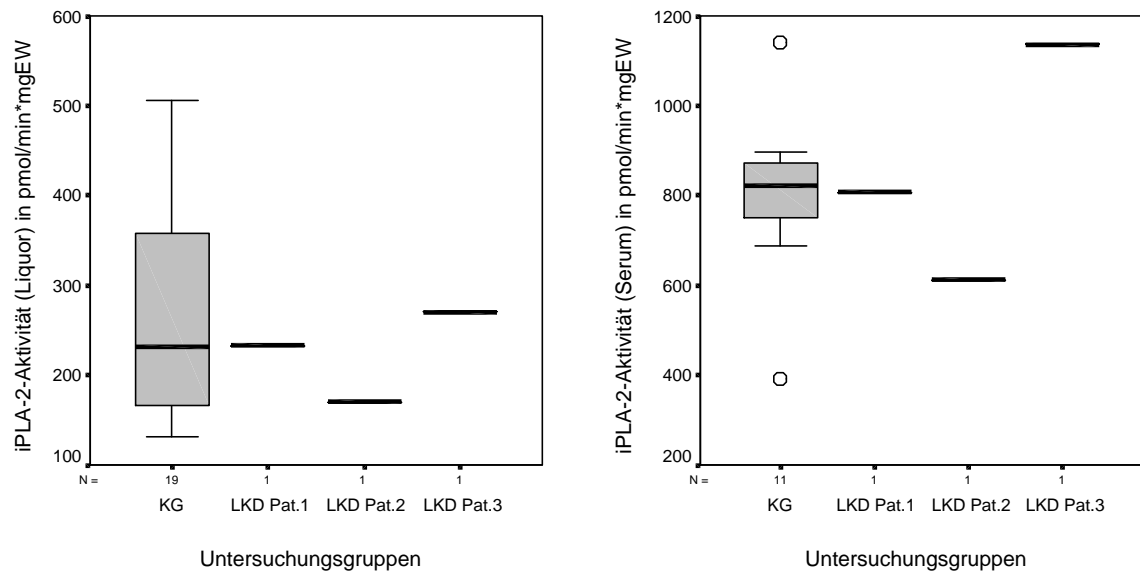
Der t-Test zu den iPLA<sub>2</sub>-Aktivitäten im Serum ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ( $t_{14; 0,975} = -0,655$ ;  $p = 0,523$ ). Hier liegt die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> sogar tendenziell über derjenigen der Kontrollgruppe.



**Abb. 27** iPLA<sub>2</sub>-Aktivität (Liquor/ Serum) im Vergleich Frontotemporale Demenz vs. Kontrollgruppe

Lewy-Körper-Demenz

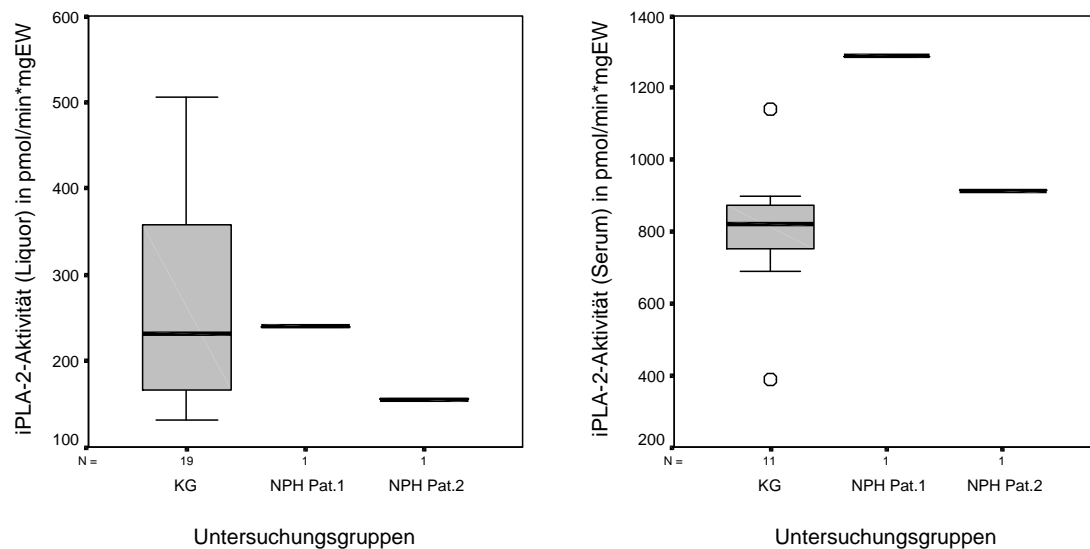
Wie aus Abbildung 28 zu entnehmen ist, liegen alle Werte der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität der Patienten mit Lewy-Körper-Demenz im Liquor innerhalb des Stichprobenquartilabstandes der Kontrollgruppe. Die Werte der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Serum zeigen große Unterschiede. Es liegt sowohl ein Wert oberhalb und ein Wert unterhalb der Spannweite als auch ein Wert innerhalb des Stichprobenquartilabstandes der Kontrollgruppe.



**Abb. 28** iPLA<sub>2</sub>-Aktivität (Liquor/ Serum) der Patienten mit Lewy-Körper-Demenz vs. Kontrollgruppe  
Pat. = Patient

### Demenz bei Normaldruckhydrozephalus

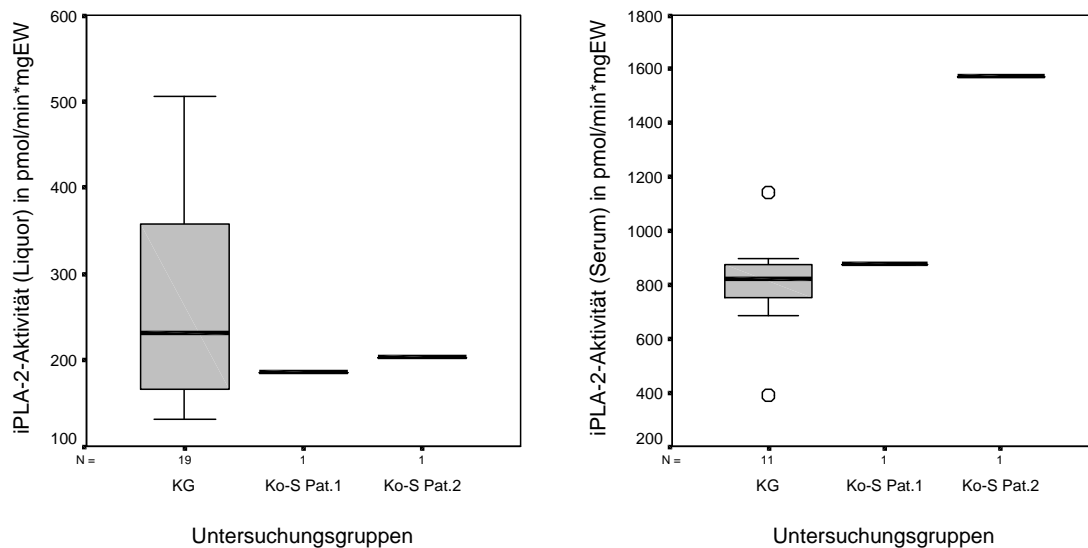
Bei den Patienten mit Demenz bei Normaldruckhydrozephalus liegt einer der Werte der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor innerhalb und einer leicht unterhalb des Stichprobenquartilabstandes des Boxplots der Kontrollgruppe. Die iPLA<sub>2</sub>-Aktivitäten im Serum liegen in beiden Fällen oberhalb des Stichprobenquartilabstandes der Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 29).



**Abb. 29** iPLA<sub>2</sub>-Aktivität (Liquor/ Serum) Demenz mit Normaldruckhydrozephalus vs. Kontrollgruppe

### Korsakow-Syndrom

Bei beiden Patienten mit Korsakow-Syndrom liegen die Werte der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor innerhalb und diejenigen der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Serum oberhalb des Stichproben-quartilabstandes der Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 30).



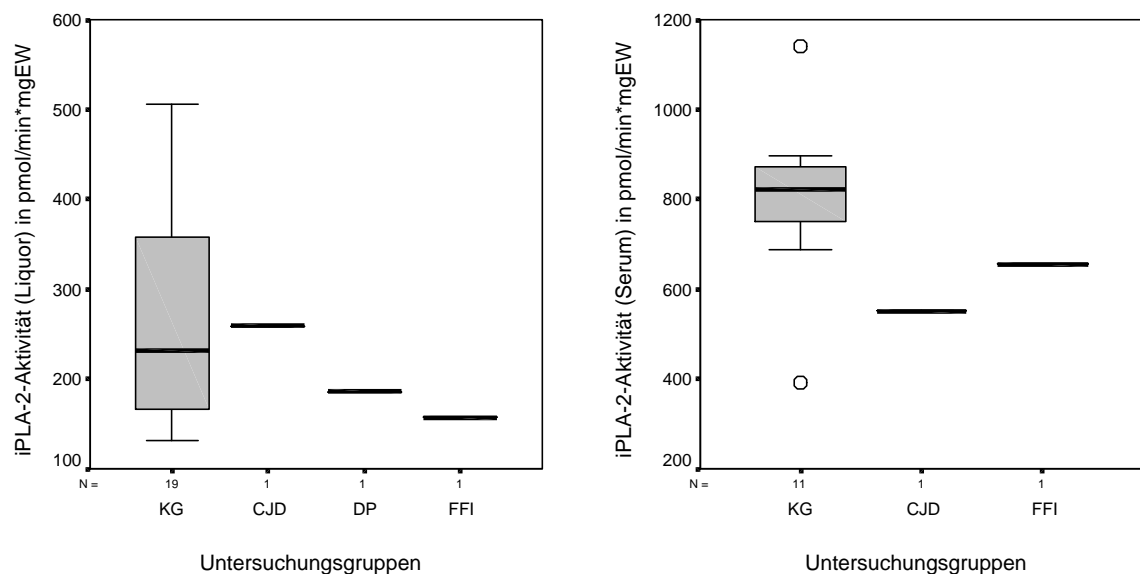
**Abb. 30** iPLA<sub>2</sub>-Aktivitäten (Liquor/ Serum) der Patienten mit Korsakow-Syndrom vs. Kontrollgruppe

### Demenzformen mit nur jeweils einem untersuchten Patienten

Die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> liegt bei dem Patienten mit Creutzfeld-Jacob-Demenz im Liquor innerhalb, im Serum deutlich unterhalb des Stichprobenquartilabstandes (vgl. Abbildung 31).

Der Wert der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor bei dem Patienten mit Demenz bei Morbus Parkinson liegt innerhalb des Stichprobenquartilabstandes der Kontrollgruppe.

Bei dem Patienten mit Fataler Familiärer Insomnie liegen sowohl der Liquorwert als auch der Serumwert der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität leicht unterhalb des Stichprobenquartilabstandes der Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 31).



**Abb. 31** iPLA<sub>2</sub>-Aktivität (Liquor/ Serum) einzelner Demenzformen im Vgl. zur Kontrollgruppe

CJD = Creutzfeld-Jacob-Demenz, DP = Demenz bei Morbus Parkinson, FFI = Fatale-Familiäre-Insomnie

## 5 Diskussion

### 5.1 Stichprobe und Methode

In die vorliegende Studie wurden 58 Patienten mit demenzieller Symptomatik und 19 Kontrollpersonen eingeschlossen. Da die Patientengruppe in die einzelnen Unterformen der Demenzen unterteilt wurde, konnten letztlich 16 Patienten mit AD, 12 Patienten mit VD und 15 Patienten mit einem Mischtyp aus beiden Formen jeweils mit der Kontrollgruppe verglichen werden. Um eine größere Gruppe von Patienten mit Alzheimerpathologie zu erhalten, wurden in einer ergänzenden Untersuchung die Gruppen der Patienten mit AD und AVD zusammengelegt. Auf diese Weise ergaben sich 31 Patienten, welche mit den Kontrollpersonen verglichen werden konnten. Damit handelt es sich bei den dargestellten Untersuchungen zur iPLA<sub>2</sub>-Aktivität um eine der größten Arbeiten bezüglich des Stichprobenumfangs. Sie ist die erste Studie überhaupt, welche sich der PLA<sub>2</sub>-Aktivität bei nicht-Alzheimer Demenzen widmet. Die differentialdiagnostische Gruppierung erfolgte mit Hilfe verschiedener Untersuchungen, Scores und Tests sowie anhand der Verlaufsbeobachtung. 12 Patienten wurden von den Untersuchungen ausgeschlossen, da bei ihnen eine eindeutige Zuordnung nicht möglich war. Auf diese Weise konnte die größtmögliche diagnostische Sicherheit gewährleistet werden, die ohne eine postmortale histopathologische Untersuchung möglich ist. Dennoch ergeben sich Abweichungen bezüglich der epidemiologischen Verteilung der einzelnen Demenzformen im Vergleich zu der unter 1.1.1 dargestellten Metaanalyse von Staehelin (Staehelin 2004). Dies ist auf verschiedene Aspekte zurückzuführen. Zum einen fehlt in der Untersuchung von Staehelin die Rubrik der AVD. Sie ist vermutlich in der Gruppe der Demenzen durch Kombination verschiedener Ursachen enthalten, die Staehelin mit 10-20 % angibt. Verschiedene Arbeitsgruppen, die sich gezielt mit dieser Fragestellung beschäftigt haben, gehen allerdings von einem Prozentsatz von um die 30 % aus (Jellinger 2002, Kalara und Ballard 1999). Zählte man in der epidemiologischen Untersuchung dieser Arbeit die Gruppe der gemischten Demenz zu derjenigen der Alzheimer Demenz, ergäbe sich ein prozentualer Anteil von 53,5 %, was nur einer Differenz von circa 1,5 % bis maximal 11,5 % zu einer zusammengefassten Gruppe aus AD und Demenzen unterschiedlicher Ursache Staehelins entsprechen würde. Zum anderen ist der untersuchte Stichprobenumfang mit 58 Personen für epidemiologische Untersuchungen generell recht klein und entstammt dem Patientenaufkommen einer Universitätsklinik mit nicht ausschließlich Versorgungsaufgaben, so dass eine Abbildung der Inzidenzen der Demenzen der Normalbevölkerung kaum erwartet werden konnte. Staehelin hingegen fügte seine

Analyse aus verschiedenen eigens der epidemiologischen Untersuchung von Demenzen gewidmeten Studien zusammen.

Die vorliegende Untersuchung zielte nicht auf epidemiologische Fragestellungen ab, sondern war der methodisch außerordentlich anspruchsvollen Untersuchung von iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor gewidmet. Bezogen auf das Untersuchungsmedium Liquor liegen nach derzeitiger Studienlage keine vergleichbaren Arbeiten anderer Untersucher vor. Alle bisherigen Studien beziehen sich auf die Untersuchung von Thrombozyten oder post mortem Hirngewebe, wie es im Kapitel 1.3.1 dargestellt wurde. Mit der Messung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor erfolgte die Nutzung des in vivo den primären pathologischen Prozessen der Demenzen nächsten erreichbaren Kompartiments. Durch den Nachweis der aus Serumuntersuchungen bekannten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor wird es in Zukunft leichter möglich sein, die Beteiligung von PLA<sub>2</sub>-Isoenzymen an neurodegenerativen Prozessen zu untersuchen. Auch das fluorometrische Verfahren selbst wurde bis dato noch von keiner Arbeitsgruppe auf die Untersuchung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität bei demenziellen Erkrankungen angewandt. Die beschriebene Methode kam bisher allein zur Messung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Serum bei Patienten mit Schizophrenie erfolgreich zur Anwendung (Smesny et al. 2005). Die Anpassung auf die Erfordernisse von Liquoruntersuchungen erfolgte erst mit der vorliegenden Studie. Bezüglich der Untersuchungen der PLA<sub>2</sub>-Aktivität bei Patienten mit Schizophrenien kamen bereits verschiedene fluorometrische Methoden zur Anwendung, davon jedoch keine im Liquor (Thuren et al. 1985, Tavares et al. 2003, Katila et al. 1997).



## 5.2 Besprechung der Gruppenvergleiche

### 5.2.1 iPLA<sub>2</sub>-Aktivität bei AD

Das wesentliche Resultat dieser Studie liegt in dem Nachweis einer signifikant verminderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor bei Patienten mit Alzheimer Demenz und Demenz vom Mischtyp aus Alzheimer und Vaskulärer Demenz im Vergleich zu den Kontrollpersonen.

Dieses Ergebnis stärkt die bisherigen Befunde zur PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Thrombozyten bzw. im Hirngewebe bei Patienten mit AD, steht aber im Widerspruch zu einigen pathophysiologischen Vorgängen, insbesondere an neuronalen Membranen, die bei demenziellen Prozessen beobachtet wurden. Widerstreitende Ansichten sollen nachfolgend dargestellt und diskutiert werden.

#### Vergleich mit früheren Studien zu PLA<sub>2</sub>-Aktivität und PLA<sub>2</sub>-Metaboliten bei AD

Mit dem oben genannten Resultat können die Ergebnisse der Studien zur iPLA<sub>2</sub>-Aktivität bei AD von Gattaz et al., Ross et al. und Talbot et al., die im Kapitel 1.3.1 ausführlich dargestellt sind, unterstützt werden (Gattaz et al. 2004, Ross et al. 1998, Talbot et al. 2000). Dass auch die cPLA<sub>2</sub> bei Patienten mit AD in ihrer Aktivität vermindert gefunden wurde, macht eine Beteiligung verschiedener PLA<sub>2</sub>-Subtypen in die pathophysiologischen Prozesse der Demenz wahrscheinlich (Gattaz et al. 1995b, Gattaz et al. 1996, Ross et al. 1998).

Die iPLA<sub>2</sub> ist, wie im Kapitel 1.2.1 beschrieben, durch die Hydrolyse der sn-2 Esterbindung wesentlich in den Um- und Abbau der Phospholipide involviert, so dass eine Zunahme des Phospholipidaufkommens bzw. eine Abnahme der Phospholipidabbauprodukte auf eine verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität zurückgeführt werden könnte. Diesen verzögerten Phospholipidumsatz bei der AD beschreiben die folgenden Studien, welche in ihrer Grundstruktur bereits im Kapitel 1.3.2 dargestellt wurden und nun im Kontext der hier gezeigten, verminderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität diskutiert werden sollen.

Der von Mulder et al. gefundene reduzierte Lysophosphosphatidylcholin/ Phosphatidylcholin-Quotient (LysoPC/ PC) bei AD-Patienten wurde von der Arbeitsgruppe als Konsequenz auf einen verminderten Phosphatidylcholinabbau gewertet (Mulder et al. 2003). Dieses Ergebnis könnte sehr gut auf eine geringere Aktivität der iPLA<sub>2</sub> zurückzuführen sein, da diese am Abbau des PCs beteiligt ist (Blusztajn et al. 1987).

Einen wichtigen Stellenwert in der Beurteilung des zerebralen Phospholipidmetabolismus nimmt die in vivo Spektroskopie ein. Mittels in vivo  $^{31}\text{P}$ -MRS haben die Arbeitsgruppen um Forlenza et al. und Brown et al. die Resonanzen von Phosphomonestern (PME) und Phosphodiestern (PDE) in Gehirnen von AD-Patienten bestimmt. Es fanden sich in beiden Arbeitsgruppen erhöhte Werte für die PME bzw. erhöhte PME/ PDE-Quotienten. Da die Resonanzen der PME den Gehalt der Phospholipidvorstufen und die der PDE den Gehalt der Phospholipidabbauprodukte reflektieren, steht dieses Ergebnis für einen verminderten Abbau von Membranphospholipiden bzw. einen generell verminderten Phospholipidumsatz (Brown et al. 1989, Forlenza et al. 2005). Weitere  $^{31}\text{P}$ -MRS-Untersuchungen zeigten isolierte Veränderungen der Phosphomonoester. Cuenod et al. beschrieben erhöhte PME-Resonanzen (Cuenod et al. 1995). Gonzales et al. fanden verminderte Werte der PDE-Resonanzen (Gonzalez et al. 1996). Einen anderen Untersuchungsgegenstand wählte die Arbeitsgruppe um Kwee et al. Sie fand mittels  $^{31}\text{P}$ -MRS erhöhte Spiegel an PUFAs in neuronalen Membranen bei AD-Patienten (Kwee et al. 1991). Im Ganzen stärken die  $^{31}\text{P}$ -MRS-Ergebnisse die Annahme verzögerter Membranumbau- und Membranabbauprozesse bei AD und stehen im Einklang mit dem hier favorisierten Interpretationsansatz für verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor.

Es gibt aber auch weniger suggestive oder ganz und gar gegensätzliche Befunde anderer Arbeitsgruppen, auf die nachfolgend eingegangen wird (für Details siehe auch Kapitel 1.3.1 und 1.3.2).

Eine kleinere immunhistochemische Studie zeigte eine Erhöhung der cPLA<sub>2</sub>-Aktivität in occipitalen und zerebellären Astrozyten (Stephenson et al. 1996). Hier wurde eine sehr geringe Probandenzahl von fünf Patienten und sechs Kontrollpersonen untersucht, die zudem bezüglich Alter und Geschlecht erhebliche Abweichungen aufwiesen, so dass die Gruppeneffekte bezogen auf die Demenz wenig zuverlässig sind. Hinzu kommt, dass es sich bei der gemessenen cPLA<sub>2</sub> nur um ein Enzym derselben Gruppe, jedoch nicht um die in der vorliegenden Untersuchung untersuchte iPLA<sub>2</sub> handelt.

Ähnliche Vorbehalte sind gegenüber der Studie von van Oijen et al. zu äußern, welche einen erhöhten Gehalt an Lp-PLA<sub>2</sub> mit einem erhöhten Demenz-Risiko in Zusammenhang bringt (van Oijen et al. 2006). Bei der Lp-PLA<sub>2</sub> handelt es sich nicht um ein am Abbau neuronaler Membranen beteiligtes Enzym, sondern um eine PAF-Acetylhydrolase. Ihre Aktivitätserhöhung geht dementsprechend mit einem verstärkten Abbau des plättchenaktivierenden Faktors einher (Blank et al. 1981, Stafforini et al. 1987). Die eventuelle Bedeutung dieses Mechanismus' für die Entstehung einer Demenz ist unklar. Allerdings wird die Lp-PLA<sub>2</sub> in

verschiedenen Studien als inflammatorischer Marker gesehen, so dass eine im Vorfeld der manifesten AD erhöhte Entzündungsaktivität eventuell als Marker der späteren demenziellen Entwicklung zu sehen ist (Stafforini et al. 1997, Memon et al. 1999). Im Zusammenhang mit der in dieser Arbeit gefundenen Aktivitätsabnahme der iPLA<sub>2</sub> erscheint der Lp-PLA<sub>2</sub>-Befund wenig bedeutsam, da der einzige Zusammenhang beider Enzyme in dem Ort der hydrolytischen Spaltung an der sn-2 Position besteht. Die jeweiligen Substrate sind sich zwar in ihrem Aufbau ähnlich, üben jedoch gänzlich verschiedene Funktionen aus.

Weiterhin fanden verschiedene Studien einen verminderten Phospholipidgehalt neuronaler Membranen bzw. eine Erhöhung der Produkte des Phospholipidabbaus bei Patienten mit AD, was eher auf eine erhöhte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität schließen lassen würde. Nitsch et al., Prasad et al. und Pettegrew et al. beschrieben einen verminderten Gehalt an Phosphatidylcholin, -inositol und -ethanolamin (Nitsch et al. 1992, Prasad et al. 1998, Pettegrew et al. 2001). Walter et al. berichteten über erhöhte Phosphocholin- und Cholin Spiegel, beides Abbauprodukte des Phosphatidylcholins (Walter et al. 2004).

Außerdem fanden sich erhöhte Spiegel an Glycerophosphocholin (GPC), welche ebenfalls auf einen erhöhten Membranabbau hindeuten (Nitsch et al. 1992, Walter et al. 2004, Pettegrew et al. 2001).

Verminderte Phospholipide und erhöhte Aufkommen an Metaboliten des Phospholipidabbaus stehen zunächst in scheinbarem Widerspruch zu der weiter oben diskutierten Abnahme iPLA<sub>2</sub>-vermittelter Phospholipidumbau- und Phospholipidabbauprozesse. Legt man jedoch eine mehrstufige Pathophysiologie zu Grunde, so könnten die Zeichen verlangsamer Phospholipidmetabolisierung Ausdruck eines biochemisch funktionellen Defizits (inklusive iPLA<sub>2</sub>-Aktivitätsverminderung) sein, während verminderte Phospholipide und gesteigerte Abbaumetabolite Zeichen des später unvermeidlichen strukturellen Abbaus (d.h. des neuronalen Untergangs) sein mögen, letzteres möglicherweise bereits abgekoppelt von suboptimaler iPLA<sub>2</sub>-Funktion. Diese integrative Betrachtung bedürfte trotz aller Plausibilität allerdings noch eines wissenschaftlichen Beweises. Diesbezüglich vorhandene Argumente sind nachfolgend aufbereitet.

### iPLA<sub>2</sub>-Aktivität und Schweregrad der Erkrankung

Die in dieser Arbeit vorliegende Differenzierung der Demenzen in drei Schweregradkategorien ist im Zusammenhang mit der Aktivitätsuntersuchung der iPLA<sub>2</sub> erstmalig vorgenommen worden. Dabei fand sich eine tendenzielle Verminderung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor bei Patienten mit einer schweren AD bzw. AVD gegenüber den Kategorien leicht und mittelschwer (vgl. Abbildung 23). Dieses Ergebnis stützt die Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Gattaz et al. Sie stellten fest, dass die Erniedrigung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Thrombozyten mit dem Ausmaß der kognitiven Störung, gemessen anhand des CAMCOG-Scores oder des MMSTs, korreliert. Im Vergleich zweier Patientengruppen, kategorisiert nach den erreichten Punkten im MMST, fanden sich außerdem signifikant erniedrigte PLA<sub>2</sub>-Aktivitätswerte in der leistungsschwächeren Gruppe (Gattaz et al. 1996). Unter der Einbeziehung von Patienten mit „mild cognitive impairment“ stellte sich heraus, dass deren PLA<sub>2</sub>-Aktivitätswerte genau zwischen denen der Probanden der Kontrollgruppe und denjenigen der AD-Gruppe lagen. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass deren Einordnung in einen demenziellen Subtyp noch ausstand (Gattaz et al. 2004). In einer Studie an Autopsieproben frontalen Hirngewebes konnte außerdem eine negative Korrelation zwischen PLA<sub>2</sub>-Aktivität und der Anzahl amyloider Plaques und neurofibrillärer Tangles festgestellt werden (Gattaz et al. 1995b). Die zitierten Studien sind unter 1.3.1 genauer dargestellt. Alle anderen Studien zur Aktivität der PLA<sub>2</sub> beinhalten keine Untersuchungen zu dieser Thematik. Resultierend aus dem vorliegenden Ergebnis und der bis dato veröffentlichten Studienlage wird die Vermutung einer Assoziation zwischen erniedrigter PLA<sub>2</sub>-Aktivität und Schweregrad der Erkrankung weiter gefestigt. Das nicht erreichte Signifikanzniveau könnte auf die geringen Gruppengrößen von jeweils 11 Patienten in der Gruppe mit leichter und mittelschwerer und nur 9 Patienten in der Gruppe mit schwerer Ausprägung der Demenz zurückzuführen sein. Gerade in letzterer machten sich die stark abweichenden Werte der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität zweier Patienten besonders in den Signifikanzberechnungen bemerkbar. Klammerte man diese aus den Berechnungen aus, ergaben sich sowohl im Vergleich zwischen leichter und schwerer als auch im Vergleich zwischen mittelschwerer und schwerer Ausprägung der demenziellen Erkrankung signifikant verminderte Werte für die schwerer betroffene Patientengruppe. Dieses Ergebnis unterstreicht die Vermutung der im Vorfeld erläuterten mehrstufigen Pathophysiologie, welche im Folgenden weiter diskutiert werden soll.

### Integrative Interpretationsansätze

Einen Schlüssel zum Verständnis der zum Teil heterogenen Befundlage bieten im Wesentlichen die im Folgenden beschriebenen Hypothesen.

Die Arbeitsgruppe um Ross et al. interpretierte die von ihnen gemessenen verminderten PLA<sub>2</sub>-Aktivitäten in Gehirnen von AD-Patienten als kompensatorischen Mechanismus, als einen Versuch der Hirnzellen, den erhöhten Membranphospholipidabbau während der degenerativen Erkrankungen zu begrenzen (Ross et al. 1998). So könnte ein Anstieg der von den Membranphospholipiden abgeleiteten intrazellulären Messenger zu einer veränderten Transkription der PLA<sub>2</sub>-kodierenden Gene führen und/oder eine posttranslationale Modifikation des Enzyms bewirken. Leider gibt es bis dato keine Studien, die belegen könnten, ob allein die Aktivität der PLA<sub>2</sub> vermindert ist oder aber der quantitative Gehalt der PLA<sub>2</sub> selbst. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass erhöhte Spiegel endogener PLA<sub>2</sub>-Inhibitoren für die verminderte Aktivität der PLA<sub>2</sub> verantwortlich sind.

In der <sup>31</sup>P-MRS-Analyse von Pettegrew et al. zeigte sich ein verminderter Phospholipidumsatz an neuronalen Membranen von Patienten mit Alzheimer Demenz am ehesten in den frühen Stadien der Erkrankung, wohingegen in späteren Stadien ein vermehrter Phospholipidumsatz zu verzeichnen war. Dabei ist letzterer zwar ein Zeichen neurodegenerativer Abbauprozesse, entspricht aber nicht notwendigerweise den primären pathogenen Mechanismen der AD (Pettegrew et al. 1997). Diese Hypothese erklärt auf den ersten Blick am plausibelsten die heterogene Befundlage bezüglich des Phospholipidumsatzes neuronaler Membranen bei AD und wird daher auch von uns favorisiert. Zum Verständnis des Befundes der erhöhten cPLA<sub>2</sub>-Aktivität bei Patienten mit AD der Arbeitsgruppe um Stephenson et al. trägt er jedoch kaum bei, da diese erst post mortem und daher vermutlich erst in späten Krankheitsstadien untersucht wurden (Stephenson et al. 1996).

Es ist zu vermuten, dass die bei der Alzheimer Demenz verminderte Aktivität der iPLA<sub>2</sub> zahlreiche pathophysiologische Mechanismen der Erkrankung mit verursacht. Hierfür finden sich verschiedene Anhaltspunkte, die in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden sollen. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist davon auszugehen, dass die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> im Verlauf der Erkrankung eher abnimmt oder allenfalls gleichstark vermindert bleibt. Dafür sprechen auch die Untersuchungen von Gattaz et al., welche in zwei voneinander unabhängigen Studien eine negative Korrelation zwischen der Aktivität der cPLA<sub>2</sub> bzw. iPLA<sub>2</sub> und dem Ausmaß der kognitiven Störung ergaben (Gattaz et al. 1996, Gattaz et al. 2004). Auch wenn in dieser Studie kein sicherer Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität aufgedeckt werden konnte, ergab sich doch

tendenziell eher eine verstärkte Aktivitätsabnahme der iPLA<sub>2</sub> bei den Patienten mit schweren Hirnleistungsstörungen (vgl. Kapitel 4.2.2). Folgt man der Interpretation einer regenerativen iPLA<sub>2</sub>-Verminderung zum Zwecke des Strukturerhalts (siehe auch Ross et al. 1998), so verliert dieses Bestreben mit Fortschreiten der Erkrankung und Zunahme der begleitenden kognitiven Funktionsausfälle trotz Intensivierung (zunehmende iPLA<sub>2</sub>-Verminderung) offenbar an Effizienz, so dass nach Ausschöpfen des regenerativen, kompensatorisch hemmenden Potentials mehr und mehr ungehemmte Abbauprozesse mit progredientem Strukturverlust nachweisbar sind (siehe auch Pettegrew et al. 1997).

Die differierenden Befunde bezüglich des Phospholipidumsatzes neuronaler Membranen bei AD können auch durch die Involvierung weiterer Enzyme, wie der Phospholipasen A<sub>1</sub>, C und D, in die Membranabbauprozesse bzw. der Acyltransferasen in die Membranaufbauprozesse mit erklärt werden (Farooqui et al. 2000b). Deren Untersuchung sowie weitere Studien, die zur Klärung der Studienabhängigkeit der Phospholipidmetabolisierung beitragen, sollten Gegenstand weiterer Forschung sein.

### Deutung einer verminderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität hinsichtlich der Pathophysiologie der AD

In den folgenden Kapiteln wird die verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität hinsichtlich der bekannten pathophysiologischen Veränderungen bei AD diskutiert.

#### *Bedeutung einer verminderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität für Membranfluidität und Membranintegrität*

Der gezielte Erhalt der Struktur und damit der Integrität neuronaler Membranen ist eine der Hauptaufgaben der PLA<sub>2</sub>. Kommt es durch pathophysiologische Prozesse zu einer Behinderung der regulären Membranerhaltungsmechanismen, ist mit vielfältigen Beeinträchtigungen, unter anderem die Permeabilität und die Enzymfunktionen betreffend, zu rechnen (Farooqui et al. 2004). Eine verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität könnte von einer Beeinträchtigung der Membranfluidität, definiert durch den Umsatz von Phospholipiden und Umbauprozesse innerhalb der Membran, begleitet sein. Veränderungen der Membranfluidität wurden in zwei Studien bei AD-Patienten gefunden, siehe auch Kapitel 1.2.3. Beide Studien wiesen eine Verminderung der Membranfluidität an neuronalen bzw. mitochondrialen Membranen bei AD-Patienten nach (Eckert et al. 2000, Mecocci et al. 1997). Andere Untersuchungen zeigten die Beeinträchtigung von Gedächtnisprozessen im Zusammenhang mit einer verminderten Fluidität der Membranen (Clarke et al. 1999, Hong 1995). Schaeffer et al. konnten in ihrer aktuellen Studie eine Reduzierung der Membranfluidität infolge der direkten Hemmung der iPLA<sub>2</sub> nachweisen (Schaeffer et al. 2005).

Im Gegensatz gibt es jedoch auch Studien, deren Messergebnisse auf eine erhöhte Membranfluidität bei Patienten mit AD hinweisen (Zubenko 1986, Zubenko et al. 1987, Hajimohammadreza et al. 1990, Kukull et al. 1992, Kalman et al. 1994, Scott et al. 1994). Dabei handelt es sich vorrangig um Untersuchungen an Thrombozyten, die als Modelle neuronaler Zellprozesse neuropsychiatrischer Erkrankungen gelten (Pletscher 1986). Da für die Rigidität der Membranen auch eine verstärkte Lipidperoxidation verantwortlich ist, wie sie in der Pathogenese der AD gefunden wird, könnten die divergierenden Ergebnisse auf den unterschiedlichen Umgang mit dem oxidativen Stress bzw. die unterschiedliche Vulnerabilität zwischen Thrombozyten und Hirngewebe zurückzuführen sein (Choe et al. 1995, Sayre et al. 1997, Nunomura et al. 2001). Die iPLA<sub>2</sub>, die auch für die Hydrolyse peroxidierte Fettsäuren verantwortlich ist und auf diesem Weg der Rigidität der Membran entgegenwirkt, könnte somit in Thrombozyten auf einen physiologischen, im Gehirn hingegen auf einen verstärkten pathologischen Gehalt peroxidierte Lipide treffen. Deren Recycling wäre dort durch die verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität nicht optimal möglich, was die Rigidität der Membran begünstigt. Auf die Rolle der verminderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in Bezug auf die Mechanismen des oxidativen Stress' wird im Weiteren noch genauer eingegangen.

Zusammengefasst deuten die vorangegangenen Darstellungen darauf hin, dass eine verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität und ein protrahierter Phospholipidturnover zwar Abbauprozesse verzögern, aber auch von einer Abnahme der Membranfluidität begleitet sein können, die sich wiederum negativ auf Gedächtnisfunktionen und die antioxidative Abwehr auswirkt.

#### *Bedeutung einer verminderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität für die Neurotransmission*

Die Funktion der PLA<sub>2</sub> spielt für die Neurotransmissionsprozesse bei AD gleich zweifach eine Rolle. Zum einen ist es möglich, dass eine verminderte Aktivität der PLA<sub>2</sub> zu einer generellen Abnahme der Signalübermittlung mittels Neurotransmittern führt. Wie in dem Kapitel 1.2.3 zur „Neurotransmission“ dargestellt, sind sowohl die iPLA<sub>2</sub> als auch ihr Produkt Arachidonsäure in Vesikelfusionsprozesse und Neurotransmitterfreisetzung involviert (Ray et al. 1999, Bloch-Shilderman et al. 2002). Hinzu kommt, dass Moskowitz et al. in ihrer Studie Hinweise fanden, dass eine Hemmung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität Exozytosevorgänge und die Freisetzung von Neurotransmittern supprimiert. Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen der Aktivität einer Ca<sup>2+</sup>-abhängigen PLA<sub>2</sub> in synaptischen Vesikeln und der Induktion einer Vesikel-Vesikel-Verschmelzung festgestellt werden (Moskowitz et al. 1982).

Zum anderen liegt einer der wichtigsten Stoffwechselwege zur Neusynthese des Acetylcholins in cholinergen Neuronen in der PLA<sub>2</sub>-vermittelten Bereitstellung von Cholin aus Phosphatidylcholin, wie sie in dem oben genannten Kapitel näher erläutert ist (Blusztajn et al. 1987, Farooqui et al. 1992). Eine verminderte Aktivität der PLA<sub>2</sub> könnte auf diese Weise das diskutierte cholinerge Defizit bei AD verstärken, welches für die kognitiven Störungen der AD-Patienten mit verantwortlich gemacht wird (Bierer et al. 1995). Dass die Wirkung der PLA<sub>2</sub> hier eine entscheidende Position einnimmt, wird daran deutlich, dass erfolgreiche Therapiekonzepte der AD auf der Hemmung der Acetylcholin verstoffwechselnden Acetylcholinesterase beruhen. Eine Erhöhung des Substratangebots z. B. durch die Gabe von Lecithin (Phosphatidylcholin) zeigte hingegen wenig Erfolg (Ellis 2005, Higgins und Flicker 2003). Dieses Phänomen könnte durch die verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität bedingt sein, da deren Funktionstüchtigkeit für die Freisetzung des Cholins aus den verabreichten Substraten Voraussetzung wäre. Dass die iPLA<sub>2</sub> in die Regulierung des Phosphatidylcholinhaushaltes tatsächlich involviert ist, macht eine Studie von Barbour et al. deutlich, in welcher gezeigt wurde, dass eine artifiziell erhöhte Phosphatidylcholinsynthese mit einer erhöhten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität beantwortet wird (Barbour et al. 1999).

In diesem Sinne könnte die verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität den wesentlichen Pathomechanismus eines verminderten Acetylcholinangebots bei AD verstärken.



### *Bedeutung einer verminderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität für die Amyloidogenese*

Wie in dem Kapitel 1.2.3 zur „APP-Sekretion“ dargestellt, ist die PLA<sub>2</sub> in die Sekretion des membrangebundenen APPs involviert. Emmerling et al. konnten nachweisen, dass eine verminderte Aktivität der PLA<sub>2</sub> zu einer reduzierten und eine verstärkte Aktivität der PLA<sub>2</sub> zu einer gesteigerten Sekretion membrangebundenen APPs führt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von kultivierten CHO-m1 Zellen mit Arachidonsäure, welche unter physiologischen Umständen durch die PLA<sub>2</sub>-vermittelte hydrolytische Abspaltung aus Phospholipiden entsteht, eine Stimulierung des sekretorischen Weges des APP-Metabolismus hervorruft (Emmerling et al. 1993, Emmerling et al. 1996). Arachidonsäure könnte damit die Mittlerrolle zwischen erhöhter PLA<sub>2</sub>-Aktivität und APP-Freisetzung einnehmen. Da eine verstärkte Sekretion von APP die Bildung von A $\beta$  verringert, ist es möglich, dass aufgrund einer verminderten PLA<sub>2</sub>-Aktivität vermehrt A $\beta$  entsteht (Caporaso et al. 1992, Fukushima et al. 1993). Die von Gattaz et al. gezeigte Korrelation zwischen einer erniedrigten PLA<sub>2</sub>-Aktivität und der Anzahl neuritischer Plaques unterstützt diese Annahme (Gattaz et al. 1996). Weiterhin könnte die PLA<sub>2</sub> die Toxizität von A $\beta$  fördern. Wie in dem oben genannten Kapitel dargestellt, erfolgt die Wirkung von A $\beta$  unter anderem über direkte elektrostatische oder hydrophobische Bindung an die neuronale Plasmamembran (Del Mar Martinez-Senac et al. 1999, van Veen und O'Shea 1995, McLaurin und Chakrabarty 1997). Durch Veränderungen der Phospholipidkomposition neuronaler Membranen, wie sie aufgrund der durch die verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität beeinträchtigten Membranreparaturprozesse entstehen könnten, käme es möglicherweise zu einer Verstärkung solcher Bindungen.

Auch bei den hier beschriebenen Vorgängen handelt es sich um die mögliche Potenzierung pathophysiologischer Mechanismen der AD, hier der Amyloidogenese, durch eine verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität.

### *Bedeutung einer verminderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität für Langzeitpotenzierung und Gedächtnis*

Die synaptische Plastizität und speziell die Langzeitpotenzierung (LTP), deren Prozesse im Kapitel 1.2.3 zu „Langzeitpotenzierung und Gedächtnis“ dargestellt sind, ist für das Lernen und die Gedächtnisbildung von immenser Bedeutung (Bliss und Collingridge 1993). Dass Veränderungen der LTP in die Pathogenese der AD involviert sind, machen verschiedene Studien deutlich, die an Tiermodellen reduzierte Aktivitäten der LTP fanden (Chapman et al. 1999, Morton et al. 2002, Dawson et al. 1999). Insbesondere die frühen Veränderungen des Kurzzeitgedächtnisses und die Beeinträchtigung der räumlichen Orientierung bei AD könnten auf Behinderungen der LTP zurückzuführen sein. Das Langzeitgedächtnis ist auf neue Lernprozesse mit Hilfe der LTP vermutlich weniger angewiesen, was seine spätere

Beteiligung am Krankheitsprozess der AD erklären könnte. Der iPLA<sub>2</sub> kommt eine essentielle Rolle in den Prozessen der synaptischen Plastizität zu. Die Arbeitsgruppe Wolf et al. behandelte Gewebescheiben aus dem Hippokampus von Ratten mit dem selektiven iPLA<sub>2</sub>-Inhibitor BEL im Vorfeld einer tetanischen Stimulation und zeigte eine eindeutige Behinderung der LTP-Ausbildung im Vergleich zu unbehandelten Gewebescheiben (Wolf et al. 1995). Fujita et al. verglichen die Effekte spezifischer iPLA<sub>2</sub>- und cPLA<sub>2</sub>-Inhibitoren. Sie fanden heraus, dass erstere die Induktion der LTP verhinderten, wohingegen letztere keinen Effekt zeigten. Hieraus wurde auf eine zentrale Rolle der iPLA<sub>2</sub> in den Prozessen der LTP geschlossen (Fujita et al. 2001). Hinzu kommt, dass verschiedene Studien, die in dem oben genannten Kapitel erläutert wurden, eine direkte Verschlechterung mnestischer Funktionen durch die intrazerebrale Hemmung der iPLA<sub>2</sub> zeigten (Holscher und Rose 1994, Fujita et al. 2000). Die in der vorliegenden Untersuchung gezeigte verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität bei AD- und AVD-Patienten könnte damit maßgeblich an der Ausprägung des klinischen Erscheinungsbildes beteiligt sein.

#### *Bedeutung einer verminderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität für die Prozesse des oxidativen Stresses*

Die hohe Empfindlichkeit neuronaler Membranen gegenüber oxidativem Stress wurde bereits im Kapitel 1.2.3 dargestellt. Sie macht eine Involvierung oxidativer Prozesse in die Pathogenese neurodegenerativer Krankheiten sehr wahrscheinlich. Diese konnten auch tatsächlich von verschiedenen Studien für die AD belegt werden (Mattson 2002, Perry et al. 2002). Hinzu kommt, dass die Vulnerabilität neuronaler Zellmembranen gegenüber Oxidationsprozessen bei AD gesteigert zu sein scheint (Hajimohammadreza und Brammer 1990). Hierfür wird vor allem die A $\beta$ -bedingte Aktivierung inflammatorischer Kaskaden und die Begünstigung von Lipidperoxidation und oxidativem Stress verantwortlich gemacht (Butterfield et al. 2002a, Butterfield et al. 2002b, Akama und Van Eldik 2000).

Einer der Schutzmechanismen neuronaler Membranen vor diesen membranschädigenden Veränderungen liegt in der Aktivierung der PLA<sub>2</sub>. Diese hydrolysiert bevorzugt peroxidierte membrandestabilisierende Fettsäuren (Salgo et al. 1993). So zeigten z. B. McLean et al., dass oxidierte Formen der Membranlipide circa achtmal schneller von Phospholipasen gespalten werden als nicht-oxidierte (McLean et al. 1993). Auch Studien von Baba et al. und van den Berg et al. unterstützen die Hypothese einer schnelleren Hydrolyse oxidierter Phospholipidmoleküle durch die PLA<sub>2</sub> (Baba et al. 1993, van den Berg et al. 1993). Die entstandenen Lysophospholipide können anschließend mit ungeschädigten Fettsäuren reacyliert werden, so dass auf diese Weise die physiologische Integrität der neuronalen Membran wieder hergestellt wird (Farooqui et al. 2000a). Kommt es nun zu einer verminderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität, könnte

dieser antioxidative Regenerationsmechanismus eingeschränkt sein und sekundär Schäden durch Oxidationsprozesse verstärken.

Andererseits zeigt eine Studie von Andersen et al. an Gehirnen von Ratten die Fähigkeit eines PLA<sub>2</sub>-Inhibitors, die durch A $\beta$  induzierte Produktion von reaktiven oxygenen Spezies abzuschwächen (Andersen et al. 2003). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die PLA<sub>2</sub> selbst in die Ausprägung oxidativer Belastung, hervorgerufen durch A $\beta$ , involviert sein könnte. Eine verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität könnte daher ebenso gut protektiv gegen oxidativen Stress wirken.

Festzustellen bleibt, dass die AD von einem erhöhten Maß an oxidativem Stress begleitet ist. Ob verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität dieses Merkmal durch verlangsamte Hydrolyse oxidierter Phospholipidmoleküle indirekt begünstigt oder auch protektive Effekte vermittelt, ist letztlich nicht abschließend zu beurteilen.

#### *Bedeutung einer verminderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität für apoptotische Prozesse*

Eine Störung apoptotische Vorgänge, am ehesten im Sinne einer Beschleunigung, scheint in der Pathogenese der AD von maßgeblicher Bedeutung zu sein (siehe auch Kapitel 1.2.3). Dabei sind die primär auslösenden Mechanismen der apoptotischen Vorgänge bisher nicht eindeutig geklärt. Oxidativer Stress, A $\beta$ -vermittelte Neurotoxizität, Veränderungen der Membranpermeabilität und Störungen der Kalziumhomöostase sind jedoch vermutlich entscheidende auslösende Komponenten (Takuma et al. 2005, Mattson 2000, Friedlander 2003, Eckert et al. 2003). Kommt es im Verlauf der Apoptose zu einer gestörten Integrität der neuronalen Membran, führt dies zu einer Verstärkung des Kalziumeinstroms in die Zelle (Williamson und Schlegel 2002, Farooqui et al. 2004). Der erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel wirkt einer Aktivierung der iPLA<sub>2</sub> entgegen, da deren Dissoziation aus dem Calmodulin-iPLA<sub>2</sub>-Komplex nur bei geringen intrazellulären Kalziumkonzentrationen vonstatten geht (Wolf et al. 1997). Somit wäre die verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität Folge der apoptotischen Vorgänge und würde eventuell erst sekundär zu den im Vorfeld beschriebenen pathophysiologischen Veränderungen führen.

Auf andere Weise wird die iPLA<sub>2</sub> im Verlauf der Fas-induzierte Apoptose beeinflusst. Über die Caspasenkaskade kommt es hier zur Aktivierung der iPLA<sub>2</sub>, siehe auch Abbildung 5 (Atsumi et al. 2000).

Alles in allem stärken die erläuterten Zusammenhänge die Annahme einer an den pathophysiologischen Prozessen der AD vielfältig beteiligten verminderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität. Diese scheint sich auf die Mechanismen der Membranfluidität und -integrität, der Neurotransmission, der Amyloidogenese, des Gedächtnisses und der Abwehr oxidativen Stresses

nachteilig auszuwirken. Die apoptotischen Vorgänge bei der AD könnten über die Störung der Kalziumhomöostase an der Entstehung der Aktivitätsminderung der iPLA<sub>2</sub> beteiligt sein. Die iPLA<sub>2</sub> kann aber auch im Sinne der eingangs geäußerten protektiven Reaktion eine Aktivitätsminderung zeigen. Eine kompensatorisch verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Sinne von Ross et al., deren regeneratives Potential dem verstärkten Phospholipidumsatz in späteren Stadien der Erkrankung nicht mehr standhalten kann, wie es die Hypothese von Pettegrew et al. vermuten lässt, erscheint mit den vorliegenden Ergebnissen vereinbar (Ross et al. 1998, Pettegrew et al. 1997).

### 5.2.2 iPLA<sub>2</sub>-Aktivität bei VD

In der Patientengruppe mit rein Vaskulärer Demenz konnte nur eine tendenzielle Verminderung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität nachgewiesen werden. Dabei ist jedoch ein Patient mit einer extrem hohen Enzymaktivität zu berücksichtigen. Lässt man diesen aus den Berechnungen heraus, erhält man auch für diese Patientengruppe eine signifikant verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Bis dato gibt es keine weiteren direkten oder indirekten Untersuchungen zur Aktivität der iPLA<sub>2</sub> bei Patienten mit VD. Es liegen lediglich Studien vor, die eine cPLA<sub>2</sub> bei akuten zerebralen Ischämien untersuchen und hier eine erhöhte Aktivität messen (Stephenson et al. 1999, Pilitsis et al. 2002). Zum einen sind jedoch iPLA<sub>2</sub> und cPLA<sub>2</sub> zu unterscheidende Enzyme, zum anderen sind die akuten Reaktionen auf eine zerebrale Ischämie nicht mit einer sich chronisch entwickelnden Vaskulären Demenz zu vergleichen.

In der Literatur werden immer wieder gemeinsame Anteile in der Pathophysiologie von AD und VD diskutiert (Hentschel et al. 2005, Jellinger 2002, Kalaria und Ballard 1999). Einige pathophysiologische Mechanismen mit möglichem Einfluss auf die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität, die bei beiden Demenzen eine Rolle zu spielen scheinen, sollen im Hinblick auf das vorliegende Ergebnis der verminderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität bei AD, VD und AVD im Folgenden diskutiert werden.

Auch bei der VD spielt eine gesteigerte Vulnerabilität und Exposition gegenüber oxidativem Stress offenbar eine wichtige Rolle. Die Arbeitsgruppe um Ihara et al. zeigte eine signifikante Erhöhung von Hydroxidionen im Blut von Patienten mit AD und VD im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ihara et al. 1997). Paragh et al. konnten verminderte Spiegel des HDL-assoziierten Antioxidanz Paraoxonase sowohl bei AD- als auch bei VD-Patienten messen (Paragh et al. 2002). Beide Arbeitsgruppen interpretierten den erhöhten oxidativen Stress als wichtigen pathophysiologischen Faktor der Demenzformen. Ähnlich den bei AD beschriebenen Mechanismen (siehe Kapitel 5.2.1) könnten durch eine verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität oxidative Membranveränderungen schlechter repariert werden (Salgo et al. 1993, McLean et al. 1993, van den Berg et al. 1993). Ein weiterer der AD und VD gemeinsamer Aspekt besteht im Vorliegen eines cholinergen Defizits (Tohgi et al. 1996, Tomimoto et al. 2005, Pratt und Perdomo 2002). Walling et al. schließen auf eine gemeinsame Endstrecke von Transmitterstörungen bei Demenzerkrankungen (Walling et al. 1989). Da die iPLA<sub>2</sub> in die Generierung des Acetylcholins eingreift, könnte ihre Aktivitätsminderung an der Entstehung der cholinergen Defizite beteiligt sein (Blusztajn et al. 1987, Farooqui et al. 1992, Barbour et al. 1999). Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass im Vergleich mit anderen

Transmittersystemen insbesondere das cholinerge System bei VD und AVD betroffen ist (Gsell et al. 2004, Gsell et al. 1996).

Die überraschenderweise auch bei VD (nach Extremwertbereinigung) eruierbare Verminderung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität lenkt die Aufmerksamkeit weg von einer AD spezifischen, iPLA<sub>2</sub>-assoziierten Abnormalität und hin zu gemeinsamen pathophysiologisch bedeutsamen neurodegenerativen Prozessen. Innerhalb dieser Abläufe scheint die iPLA<sub>2</sub>-Funktion generell vermindert zu sein. Verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität wäre dann Teil einer eher unspezifischen, allerdings bei AD besonders ausgeprägten, pathophysiologischen Endstrecke. Ihr wäre damit keine primär ursächliche, wohl aber eine modulierende bzw. sekundär potenzierende Bedeutung beizumessen. Aus der komplexen Einbindung der iPLA<sub>2</sub> in Membranrepair- und Membranremodelingprozesse, Neurotransmission, antioxidative Abwehr und Apoptose ergeben sich Implikationen für Diagnostik und Therapie demenzieller Erkrankungen. Es bleibt auch festzustellen, dass der scheinbare Eindruck einer Spezifität iPLA<sub>2</sub>-assoziierter Aspekte für die AD durch die fast ausschließliche Untersuchung dieser Patientengruppe begünstigt wird. Die vorliegenden Ergebnisse bei VD könnten daher Ausgangspunkt für entsprechende Untersuchungen anderer Demenzen sein.

### 5.3 Zusammenhang zwischen der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in Serum und Liquor

Wie aus dem Ergebnisteil unter 4.2.3 ersichtlich, ergab sich der erwartete Zusammenhang zwischen den Aktivitätswerten der iPLA<sub>2</sub> in Serum und Liquor nicht. Weiterhin konnten keine signifikanten Unterschiede der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Serum zwischen Patienten- und Kontrollgruppe ermittelt werden. Andererseits wurde in den Kapiteln zur Differenzierung und Identifikation der iPLA<sub>2</sub> unter 3.4 und 3.5 ausgeführt, dass es sich in beiden Kompartimenten um das gleiche gemessene Enzym handelt. Eine Korrelation der Aktivitätswerte bzw. vergleichbare Ergebnisse wären also konsequenterweise zu erwarten gewesen. Ausgehend von einem systemisch ausgeprägten Phänomen wäre theoretisch ein Konzentrationsgleichgewicht bezüglich der iPLA<sub>2</sub> zwischen Blut- und Liquorkompartiment möglich, wobei sich in der Regel eine sigmoid verlaufende Korrelationskurve ergeben würde. Diese entstünde, weil neben der Größe des Moleküls auch die Liquorflussgeschwindigkeit für die Verteilung der Moleküle zwischen Liquor und Serum entscheidend ist. Die Flussbewegung des Liquors verhindert außerdem einen vollständigen Konzentrationsausgleich zwischen der Serum- und der Liquorkonzentration der Proteine. Beinahe alle Proteine sind in der Lage die Blut-Liquor-Schranke zu passieren und entsprechend mit einem Molekülgrößen- und Liquorflussgeschwindigkeits-abhängigen Konzentrationsgradienten im anderen Kompartiment nachweisbar (Reiber 2005). Da in der vorliegenden Studie jedoch nicht die Menge der iPLA<sub>2</sub>, sondern deren Aktivität gemessen wurde, die je nach regionärem Bedarf variieren kann, wäre es durchaus denkbar, dass sich zwar ein Gleichgewicht der Enzymproteinmenge ergibt, nicht aber der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität. Weiterhin könnte die fehlende Korrelation zwischen Serum- und Liquorwerten auch durch Überlegungen zur Affektion der Blut-Hirnschranke bei demenziellen Erkrankungen, wie sie von Kalaria zusammengefasst wurden, erklärt werden (Kalaria 1999). Ist die Blut-Hirnschranke in die pathophysiologischen Prozesse der AD und eventuell auch der anderen Demenzen involviert, wäre ein reguläres Gleichgewicht der Phospholipasen zwischen Serum und Liquor kaum zu erwarten. Eine andere eher methodische Ursache könnte darin liegen, dass in der vorliegenden Messreihe eine Analyse von Liquor und Serum eines Probanden nicht immer im selben analytischen Lauf gewährleistet wurde. Dies könnte zu einer Verminderung der analytischen Sensitivität bezüglich des Zusammenhangs beider Werte geführt haben. Bei zukünftigen Untersuchungen wäre deshalb versuchsshalber auf einen synchronen Untersuchungsablauf zu achten.

Dafür, dass sich im Serum keine Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe zeigten, lassen sich ebenfalls verschiedene Erklärungsansätze finden. So ist anzunehmen, dass es sich bei den Veränderungen der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität nicht um systemische, sondern um lokale

insbesondere zentrale Prozesse handelt, die sich in dem großen Kompartiment Serum kaum bemerkbar machen dürften. Da die Befunde der verminderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität bei AD von anderen Arbeitsgruppen auch in Thrombozyten gefunden wurden, handelt es sich aber vermutlich um keinen rein auf das zentrale Nervensystem bezogenen Befund (Gattaz et al. 1996, Gattaz et al. 2004). Hier könnte jedoch auch ein ähnliches pathophysiologisches Verhalten von neuronalem Gewebe und Thrombozyten eine Rolle spielen. Thrombozyten gelten als Modelle neuronaler Zellprozesse bei neuropsychiatrischen Erkrankungen (Pletscher 1986). Sie werden des öfteren als periphere Marker für neuronale Veränderungen genutzt, da sie einige gemeinsame Membran- und Rezeptoreigenschaften mit Neuronen zeigen (Zubenko et al. 1999). Es wäre denkbar, dass die im zentralen Nervensystem auftretenden Veränderungen auch in Thrombozyten, aber nicht generell in der Peripherie nachweisbar sind. Weiterhin ist denkbar, dass sich die Gesamtaktivität der iPLA<sub>2</sub> in dem im Vergleich zum Liquor sehr großen Kompartiment des Serums durch wesentlich vielfältigere Prozesse ergibt, so dass die mit der demenziellen Symptomatik zusammenhängenden Veränderungen zwar auch, aber weniger deutlich zur Ausprägung kommen.

Die dargestellten Erläuterungen zeigen, dass auch in Zukunft Liquor das Medium der Wahl für die Messung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität sein sollte, da sich die Aktivitätsveränderungen im Serum nicht abbilden lassen. Dies ist vermutlich auf die Größe und die Vielfalt physiologischer und pathologischer Prozesse in diesem Kompartiment zurückzuführen.



#### 5.4 iPLA<sub>2</sub>-Aktivität und Alter

Zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen iPLA<sub>2</sub>-Aktivität und Alter wurde eine Korrelationsanalyse angewandt, siehe Kapitel 4.2.4, die weder in der gesamten Probandengruppe noch in der Kontrollgruppe allein signifikante Ergebnisse ergab. Die unter 1.3.1 aufgeführten Arbeitsgruppen schlossen die Variable des Alters nicht in ihre Untersuchungen zur PLA<sub>2</sub>-Aktivität bei demenziellen Erkrankungen ein. Die Arbeitsgruppe um Smesny et al. untersuchte im Rahmen der Aktivitätsmessungen der iPLA<sub>2</sub> bei Schizophrenie den Einfluss des Alters auf die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in der Kontrollgruppe und fand keine Zusammenhänge (Smesny et al. 2005). Weitere Untersuchungen am Menschen zu Veränderungen der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Bezug auf das Alter stehen noch aus. Es liegen lediglich Erhebungen an Ratten und Rhesusaffen vor. Bei ersteren fand man sowohl Erhöhungen als auch Verminderungen der PLA<sub>2</sub>-Aktivität bei älteren Tieren (Williams et al. 1994, Kim et al. 1997). Bei den Rhesusaffen ergab sich ein erhöhter Gehalt an cPLA<sub>2</sub> im Zerebellum der jüngeren Gruppe (Weerasinghe et al. 2006). Für eine Diskussion des Aspektes Alter und PLA<sub>2</sub>-Aktivität sind weitere Untersuchungen am Menschen abzuwarten. Da jedoch sowohl in der vorliegenden Studie als auch in derjenigen der Arbeitsgruppe um Smesny et al. kein Zusammenhang nachgewiesen werden konnten, ist zunächst davon auszugehen, dass zumindest ein gravierender Einfluss unwahrscheinlich ist.

### 5.5 iPLA<sub>2</sub>-Aktivität und Geschlecht

Die Untersuchungen zum Einfluss des Geschlechts auf die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität, die im Kapitel 4.2.5 dargestellt wurden, ergaben keine signifikanten Effekte. In den bis dato vorliegenden Arbeiten zur PLA<sub>2</sub>-Aktivität bei AD, dargestellt unter 1.3.1, wurde der Einfluss des Geschlechts auf die Aktivität des Enzyms nicht untersucht. Es gibt bis dato nur sehr wenige Studien, die diesen Aspekt berücksichtigen. Die bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnte Studie der Arbeitsgruppe um Smesny et al. zur iPLA<sub>2</sub>-Aktivität bei Schizophrenie zeigte keinen Einfluss des Geschlechts auf die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität (Smesny et al. 2005). Zwei weitere Studien zu dieser Thematik zeigen gegenteilige Befunde. Kuslys et al. untersuchten gesunde Probanden und fanden erhöhte PLA<sub>2</sub>-Aktivitäts-Werte in der Gruppe der Frauen (Kuslys et al. 1996). Brilakis et al. untersuchten eine Lipoprotein-assoziierte PLA<sub>2</sub> bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und fanden hier einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten Spiegel der PLA<sub>2</sub> und männlichem Geschlecht (Brilakis et al. 2005). Um diesen eventuellen Einflussfaktor auszuklammern, sollten weiterführende Untersuchungen möglichst eine geschlechtsspezifische Parallelisierung anstreben bzw. die Untersuchungen getrennt nach Geschlechtern vornehmen. Da jedoch auch die Arbeitsgruppe um Ross et al., welche eine solche Parallelisierung durchführte, signifikant verminderte Aktivitäten der cPLA<sub>2</sub> und der iPLA<sub>2</sub> fand, ist davon auszugehen, dass ein eventuell vorliegender Einfluss des Geschlechts für die Untersuchungen zur PLA<sub>2</sub>-Aktivität bei AD kaum von Bedeutung ist (Ross et al. 1998).

## 5.6 iPLA<sub>2</sub>-Aktivität und Medikamenteneinnahme

### 5.6.1 ASS

Die Einnahme von ASS (100 mg/d) hat, wie im Kapitel 4.2.6 gezeigt, keinen Einfluss auf die Aktivität der untersuchten Phospholipase. Diese Untersuchung wurde vor allem vor dem Hintergrund zahlreicher Studien bezüglich des präventiven Charakters von NSAIDs (non steroidal anti-inflammatory drugs) bei Demenzen durchgeführt, welche ebenso wie die Acetylsalicylsäure ihre Wirkung vor allem über eine Hemmung der Cyclooxygenase entfalten. Eine abschließende Betrachtung zu der Evidenz von NSAIDs bei AD hat bis heute noch nicht erfolgen können, da die Studienlage noch immer widersprüchlich ist (Breitner 1996, Tabet und Feldmand 2003, Dokmeci 2004). Die Cyclooxygenase ist das der PLA<sub>2</sub> nachgeschaltete Enzym bei der Generierung von Prostaglandinen, so dass sich eine Hemmung rekurrent auf die Aktivität der PLA<sub>2</sub> auswirken könnte. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Ergebnisse in den vorliegenden Untersuchungen, was allerdings auch daran liegen könnte, dass die eingenommene Dosis an ASS sehr klein war. Zur direkten Wirkung von NSAIDs bzw. ASS auf die PLA<sub>2</sub>-Aktivität konnten keine Studien gefunden werden.

### 5.6.2 Acetylcholinesterasehemmer

Acetylcholinesterasehemmer, welche den Abbau von Acetylcholin im synaptischen Spalt vermindern und damit dessen Angebot wieder erhöhen, gehören zur Standardmedikation bei Patienten mit AD. Ein Einfluss der Einnahme von Acetylcholinesterasehemmern auf die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität konnte in der vorliegenden Untersuchung ausgeschlossen werden (vgl. Kapitel 4.2.6). Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe Gattaz et al. von 2004 zeigten das gleiche Ergebnis (Gattaz et al. 2004). Eine nur auf die Medikation zurückzuführende Veränderung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in der Gruppe der Patienten mit AD ist somit wenig wahrscheinlich. Weitere Studien zur Untersuchung dieses Sachverhalts liegen bis dato nicht vor, sind aber dringend notwendig.

### 5.7 Bedeutung der Veränderung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität für weitere Demenzformen

Eine auswertende Interpretation ist bei den restlichen untersuchten Demenzformen aufgrund der geringen Stichprobengröße nur sehr begrenzt möglich. Auffallend ist, dass auch die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor der fünf Patienten mit FTD im Vergleich zur Kontrollgruppe eher vermindert zu sein scheint, siehe Kapitel 4.3.

Wie bei AD, VD und AVD wurden auch für die FTD, die LKD und die CJD Prozesse oxidativen Stresses nachgewiesen (Gerst et al. 1999, Castellani et al. 1995, Dalfo et al. 2005, Arlt et al. 2002, Van Everbroeck et al. 2004). Verminderungen des Transmitters Acetylcholin konnten auch für die LKD und die DP nachgewiesen werden (Dalfo et al. 2004, Jellinger 1997). Bei diesen beiden pathophysiologischen Prozessen spielt die iPLA<sub>2</sub> in der beschriebenen Form eine Rolle (vgl. Kapitel 1.2.3 und 5.2.1), so dass weitere Untersuchungen mit größerem Stichprobenumfang interessant sein könnten.

## 6 Schlussfolgerungen

In den nachfolgenden Erläuterungen sollen die diskutierten Ergebnisse in Bezug auf die eingangs aufgestellten Hypothesen gewertet und ihre Relevanz für die weitere psychiatrische Forschung und klinische Anwendung überprüft werden.

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich eine deutlich verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Liquor bei Patienten mit AD bzw. AVD im Vergleich zu den Kontrollpersonen. Die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität wurde erstmals im Liquor, als das den pathologischen Prozessen der Demenz nächste in vivo untersuchbare Medium, untersucht. Da die iPLA<sub>2</sub> wesentlich in die Prozesse des Membranabbaus involviert ist, ergibt sich aus diesem Ergebnis entsprechend der „Membran-Phospholipid-Hypothese“ von Horrobin et al., dass eine regelrechte Funktion der Transmitter- und Rezeptorsysteme nicht mehr gewährleistet werden kann (Six und Dennis 2000, Horrobin 1998). Die Störung dieser und anderer pathophysiologischer Mechanismen der Demenzen konnte mit einer verminderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in Zusammenhang gebracht werden. Dabei zeigten sich bezüglich des Phospholipidumsatzes neuronaler Membranen bei AD heterogene Befunde. Hier müssen weitere Studien Klarheit bringen. Interessant wäre die Verknüpfung einer Studie zur iPLA<sub>2</sub>-Aktivität mit Untersuchungen mittels <sup>31</sup>P-MRS-Technik bei einem gemeinsamen Patientenkollektiv. Eine Korrelationsprüfung zwischen iPLA<sub>2</sub>-Aktivität und Membranabbauprozessen könnte darstellen, inwieweit sich eine verminderte Aktivität des Enzyms hier tatsächlich auswirkt oder ob der Frage nach der Involvierung weiterer am Membranabbau und -aufbau beteiligter Enzyme in die Prozesse der demenziellen Erkrankungen nachgegangen werden muss. Relativ eindeutig ist die Studienlage allerdings bezüglich zahlreicher weiterer pathophysiologischer Mechanismen der AD, an denen die verminderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität beteiligt zu sein scheint. Vermutlich wirkt sich die verminderte Aktivität der iPLA<sub>2</sub> verstärkend auf die gestörte Membranfluidität bzw. -integrität, die veränderte Neurotransmission, die Amyloidogenese, die Gedächtnisdefizite und den hohen Gehalt an oxidativem Stress bei demenziellen Prozessen aus. Da eine gesteigerte iPLA<sub>2</sub>-Aktivitätsabnahme mit zunehmender Erkrankungsschwere nach unseren Ergebnissen wahrscheinlich ist, könnte sich die Beeinflussung der genannten pathophysiologischen Mechanismen ebenfalls steigern. Um den Zusammenhang zwischen iPLA<sub>2</sub>-Aktivität und Schwere der Erkrankung weiter zu verifizieren, sollte in kommenden Untersuchungen die Patientenzahl vergrößert werden, so dass abweichende Werte einzelner Patienten weniger stark ins Gewicht fallen.

Wodurch die Aktivitätsminderung der iPLA<sub>2</sub> verursacht wird, bleibt weiterhin unklar. Einen Anhaltspunkt bieten lediglich die apoptotischen Prozesse im Verlauf der AD, in deren Verlauf sich eine gestörte Kalziumhomöostase hinsichtlich einer Aktivitätsminderung der iPLA<sub>2</sub> auswirken könnte. Da der Umfang der dieser Hypothese zu Grunde liegenden Studien gering ist und sich zum Teil widersprüchliche Aussagen finden, muss in weiteren Untersuchungen dringend der Frage nachgegangen werden, auf welchen Wegen es zu der Aktivitätsminderung der iPLA<sub>2</sub> kommt. Einen Untersuchungsschwerpunkt sollten hier die Regulationsmechanismen der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität spielen, die zum Teil noch unklar bzw. unvollständig sind. Da auch bei weiteren Demenzformen durch die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität beeinflusste pathophysiologische Mechanismen eine Rolle spielen, wäre es sinnvoll diese in weitere Studien mit einzubeziehen. Insbesondere bei der Vaskulären und bei der Frontotemporalen Demenz zeigt sich ebenfalls eine tendenzielle Abnahme der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies spricht für ähnliche pathophysiologische Endstrecken der demenziellen Erkrankungen und eine relative Unspezifität der iPLA<sub>2</sub>-Veränderungen. Eine Untersuchung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität an einem größeren Patientenkollektiv wäre für den eindeutigen Nachweis wünschenswert.

Nicht bestätigt fand sich die eingangs aufgestellte Hypothese der gleichermaßen veränderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in Serum und Liquor. Weder konnten im Serum Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe gefunden werden, noch zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Serum- und Liquorwerten. Ob die Ursachen darin liegen, dass die Prozesse der veränderten iPLA<sub>2</sub>-Aktivität sich ausschließlich zentral bzw. an den, der neuronalen Membran ähnlichen, Thrombozytenmembranen abspielen oder aber sich die veränderte iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Serum aufgrund sich hier abspielender vielfältigerer Mechanismen bzw. der Größe des Kompartiments nicht abbildet, konnte nicht abschließend geklärt werden. Da im Vorfeld der Messungen eine eindeutige Identifizierung der iPLA<sub>2</sub> in Serum und Liquor als das gleiche Enzym erbracht wurde, muss davon ausgegangen werden, dass sich die Veränderungen der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Serum mit der hier angewandten Methode nicht nachweisen lassen, so dass für weitere Untersuchungen Liquor das Medium der Wahl bleibt.

Bestätigt wurde gefunden, dass das Alter, das Geschlecht und die Einnahme von ASS 100 bzw. von Acetylcholinesterasehemmern keinen Einfluss auf die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität haben, so dass auch in zukünftigen Studien nicht zwangsläufig eine Alters- und Geschlechtsparallelisierung vorgenommen bzw. der Aspekt der Einnahme der genannten Medikamente berücksichtigt werden muss. Insbesondere sollten diese Faktoren nicht zu einer Dezimierung der Anzahl der Probanden führen.

Weitere Forschung auf dem Gebiet des Membranphospholipidmetabolismus bei demenziellen Erkrankungen, insbesondere im Bereich der PLA<sub>2</sub>-Aktivitätsveränderungen erscheint gerechtfertigt und zukunftsweisend. Aus dem Verständnis der genauen pathophysiologischen Zusammenhänge könnten sich wesentliche präventive, diagnostische und therapeutische Ansätze ableiten, die insbesondere vor dem Hintergrund des zunehmenden Anteils älterer Menschen in unserer Gesellschaft von immenser Bedeutung nicht nur für den einzelnen Menschen, sondern auch in gesundheitspolitischer und gesundheitsökonomischer Hinsicht wären.

## Literaturverzeichnis

- Akama KT, Van Eldik LJ. 2000. Beta-amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1 $\beta$ - and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-dependent, and involves a TNF $\alpha$  receptor-associated factor- and NF $\kappa$ B-inducing kinase-dependent signaling mechanism. *J Biol Chem*, 275 (11):7918-7924.
- Akiba S, Sato T. 2004. Cellular function of calcium-independent phospholipase A2. *Biol Pharm Bull*, 27 (8):1174-1178.
- Andersen JM, Myhre O, Fonnum F. 2003. Discussion of the role of the extracellular signal-regulated kinase-phospholipase A2 pathway in production of reactive oxygen species in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*, 28 (2):319-326.
- Arlt S, Kontush A, Zerr I, Buhmann C, Jacobi C, Schroter A, Poser S, Beisiegel U. 2002. Increased lipid peroxidation in cerebrospinal fluid and plasma from patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Dis*, 10 (2):150-156.
- Atsumi G, Tajima M, Hadano A, Nakatani Y, Murakami M, Kudo I. 1998. Fas-induced arachidonic acid release is mediated by Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 but not cytosolic phospholipase A2, which undergoes proteolytic inactivation. *J Biol Chem*, 273 (22):13870-13877.
- Atsumi G, Murakami M, Kojima K, Hadano A, Tajima M, Kudo I. 2000. Distinct roles of two intracellular phospholipase A2s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A2 $\alpha$  inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 augments spontaneous fatty acid release. *J Biol Chem*, 275 (24):18248-18258.
- Austin SC, Funk CD. 1999. Insight into prostaglandin, leukotriene, and other eicosanoid functions using mice with targeted gene disruptions. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 58 (5-6):231-252.
- Baba N, Nikami Y, Shigeta Y, Nakajima S, Kaneko T, Matsuo M. 1993. Hydrolysis of glycerophosphocholine hydroperoxide by phospholipase A<sub>2</sub>. *Biosci Biotechnol Biochem*, 57:2200-2201.
- Balsinde J, Balboa MA, Dennis EA. 1997. Antisense inhibition of group VI Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D1 macrophages. *J Biol Chem*, 272 (46):29317-29321.
- Barany M, Chang YC, Arus C, Rustan T, Frey WH, 2nd. 1985. Increased glycerol-3-phosphorylcholine in post-mortem Alzheimer's brain. *Lancet*, 1 (8427):517.
- Barbour SE, Kapur A, Deal CL. 1999. Regulation of phosphatidylcholine homeostasis by calcium-independent phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta*, 1439 (1):77-88.
- Bartels C. 2005. Demenz bei degenerativen Systemerkrankungen. In: Wallesch CW, Förstl H, Hrsg. *Demenzen*. 1te Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 195-208.
- Bazan NG, Jr. 1970. Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochim Biophys Acta*, 218 (1):1-10.
- Berger M. 2004. *Psychische Erkrankungen*. 2te Aufl. München: Elsevier GmbH.
- Berk PD, Stump DD. 1999. Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids. *Mol Cell Biochem*, 192 (1-2):17-31.
- Bickel H. 1999. Deskriptive Epidemiologie der Demenzen. *Psychiatrie der Gegenwart*, 4:33-52.
- Bickel H. 2000. [Dementia syndrome and Alzheimer disease: an assessment of morbidity and annual incidence in Germany]. *Gesundheitswesen*, 62 (4):211-218.
- Bickel H. 2005. Epidemiologie und Gesundheitsökonomie. In: Wallesch CW, Förstl H, Hrsg. *Demenzen*. 1te Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1-15.



- Bierer LM, Haroutunian V, Gabriel S, Knott PJ, Carlin LS, Purohit DP, Perl DP, Schmeidler J, Kanof P, Davis KL. 1995. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J Neurochem*, 64 (2):749-760.
- Birbes H, Gothie E, Pageaux JF, Lagarde M, Laugier C. 2000. Hydrogen peroxide activation of Ca(2+)-independent phospholipase A(2) in uterine stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 276 (2):613-618.
- Blank ML, Lee T, Fitzgerald V, Snyder F. 1981. A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet-activating lipid). *J Biol Chem*, 256 (1):175-178.
- Bliss TV, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361 (6407):31-39.
- Bloch-Shilderman E, Abu-Raya S, Trembovler V, Boschwitz H, Gruzman A, Linial M, Lazarovici P. 2002. Pardaxin stimulation of phospholipases A2 and their involvement in exocytosis in PC-12 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 301 (3):953-962.
- Blusztajn JK, Liscovitch M, Richardson UI. 1987. Synthesis of acetylcholine from choline derived from phosphatidylcholine in a human neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (15):5474-5477.
- Bramham CR, Alkon DL, Lester DS. 1994. Arachidonic acid and diacylglycerol ACT synergistically through protein kinase C to persistently enhance synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience*, 60 (3):737-743.
- Breitner JC. 1996. The role of anti-inflammatory drugs in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Annu Rev Med*, 47:401-411.
- Brilakis E, McConnell J, Lennon R, Elesber A, Meyer J, Berger P. 2005. Association of lipoprotein-associated phospholipase A2 levels with coronary artery disease risk factors, angiographic coronary artery disease, and major adverse events at follow-up. *Eur Heart J*, 26 (2):137-144.
- Brown GG, Levine SR, Gorell JM, Pettegrew JW, Gdowski JW, Bueri JA, Helpner JA, Welch KM. 1989. In vivo <sup>31</sup>P NMR profiles of Alzheimer's disease and multiple subcortical infarct dementia. *Neurology*, 39 (11):1423-1427.
- Butterfield DA. 2002. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res*, 36 (12):1307-1313.
- Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J. 2002a. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging*, 23 (5):655-664.
- Butterfield DA, Griffin S, Munch G, Pasinetti GM. 2002b. Amyloid beta-peptide and amyloid pathology are central to the oxidative stress and inflammatory cascades under which Alzheimer's disease brain exists. *J Alzheimers Dis*, 4 (3):193-201.
- Camandola S, Poli G, Mattson MP. 2000. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal increases AP-1-binding activity through caspase activation in neurons. *J Neurochem*, 74 (1):159-168.
- Caporaso GL, Gandy SE, Buxbaum JD, Ramabhadran TV, Greengard P. 1992. Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (7):3055-3059.
- Castellani R, Smith MA, Richey PL, Kalaria R, Gambetti P, Perry G. 1995. Evidence for oxidative stress in Pick disease and corticobasal degeneration. *Brain Res*, 696 (1-2):268-271.
- Chan PH. 1996. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke*, 27 (6):1124-1129.

- Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG, Hsiao KK. 1999. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci*, 2 (3):271-276.
- Choe M, Jackson C, Yu BP. 1995. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radic Biol Med*, 18 (6):977-984.
- Chui HC, Victoroff JJ, Margolin D, Jagust W, Shankle R, Katzman R. 1992. Criteria for the diagnosis of ischemic vascular dementia proposed by the State of California Alzheimer's Disease Diagnostic and Treatment Centers. *Neurology*, 42 (3 Pt 1):473-480.
- Clarke MS, Prendergast MA, Terry AV, Jr. 1999. Plasma membrane ordering agent pluronic F-68 (PF-68) reduces neurotransmitter uptake and release and produces learning and memory deficits in rats. *Learn Mem*, 6 (6):634-649.
- Crews FT. 1982. Rapid changes in phospholipid metabolism during secretion and receptor activation. *Int Rev Neurobiol*, 23:141-163.
- Cuenod CA, Kaplan DB, Michot JL, Jehenson P, Leroy-Willig A, Forette F, Syrota A, Boller F. 1995. Phospholipid abnormalities in early Alzheimer's disease. In vivo phosphorus 31 magnetic resonance spectroscopy. *Arch Neurol*, 52 (1):89-94.
- Dalfo E, Albasanz JL, Martin M, Ferrer I. 2004. Abnormal metabotropic glutamate receptor expression and signaling in the cerebral cortex in diffuse Lewy body disease is associated with irregular alpha-synuclein/phospholipase C (PLCbeta1) interactions. *Brain Pathol*, 14 (4):388-398.
- Dalfo E, Portero-Otin M, Ayala V, Martinez A, Pamplona R, Ferrer I. 2005. Evidence of oxidative stress in the neocortex in incidental Lewy body disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64 (9):816-830.
- Damer CK, Creutz CE. 1994. Secretory and synaptic vesicle membrane proteins and their possible roles in regulated exocytosis. *Prog Neurobiol*, 43 (6):511-536.
- Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S, O'Dowd G, Bowery BJ, Boyce S, Trumbauer ME, Chen HY, Van der Ploeg LH, Sirinathsinghji DJ. 1999. Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience*, 90 (1):1-13.
- Del Mar Martinez-Senac M, Villalain J, Gomez-Fernandez JC. 1999. Structure of the Alzheimer beta-amyloid peptide (25-35) and its interaction with negatively charged phospholipid vesicles. *Eur J Biochem*, 265 (2):744-753.
- Dennis EA, Rhee SG, Billah MM, Hannun YA. 1991. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *Faseb J*, 5 (7):2068-2077.
- Deutsches Institut für medizinische Dokumentation und Information, Hrsg. 2004. ICD-10-GM Version 2005. 10te Aufl. Deutsche Krankenhaus Verlagsgesellschaft mbH.
- Dokmeci D. 2004. Ibuprofen and Alzheimer's disease. *Folia Med (Plovdiv)*, 46 (2):5-10.
- Drapeau C, Pellerin L, Wolfe LS, Avoli M. 1990. Long-term changes of synaptic transmission induced by arachidonic acid in the CA1 subfield of the rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 115 (2-3):286-292.
- Eckert A, Keil U, Marques CA, Bonert A, Frey C, Schussel K, Muller WE. 2003. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*, 66 (8):1627-1634.
- Eckert GP, Cairns NJ, Maras A, Gattaz WF, Muller WE. 2000. Cholesterol modulates the membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides in the hippocampus: specific changes in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 11 (4):181-186.

- Edlund C, Soderberg M, Kristensson K, Dallner G. 1992. Ubiquinone, dolichol, and cholesterol metabolism in aging and Alzheimer's disease. *Biochem Cell Biol*, 70 (6):422-428.
- Ellis JM. 2005. Cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. *J Am Osteopath Assoc*, 105 (3):145-158.
- Ellis RJ, Olichney JM, Thal LJ, Mirra SS, Morris JC, Beekly D, Heyman A. 1996. Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, Part XV. *Neurology*, 46 (6):1592-1596.
- Emmerling MR, Moore CJ, Doyle PD, Carroll RT, Davis RE. 1993. Phospholipase A2 activation influences the processing and secretion of the amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 197 (1):292-297.
- Emmerling MR, Dudley DT, Dyer RD, Carroll RT, Doyle PD, Davis RE. 1996. The role of arachidonic acid in the secretion of the amyloid precursor protein (APP). *Ann N Y Acad Sci*, 777:310-315.
- Erkinjuntti T, Kurz A, Gauthier S, Bullock R, Lilienfeld S, Damaraju CV. 2002. Efficacy of galantamine in probable vascular dementia and Alzheimer's disease combined with cerebrovascular disease: a randomised trial. *Lancet*, 359:1283-1290.
- Exton JH. 1994. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim Biophys Acta*, 1212 (1):26-42.
- Exton JH. 1997. Phospholipase D: enzymology, mechanism of regulation and function. *Physiol Rev*, 77:303-320.
- Farooqui AA, Hirashima Y, Horrocks LA. 1992. Brain phospholipases and their role in signal transduction. In: Bazan NG, Toffano G, Murphy M, Hrsg. *Neurobiology of Essential Fatty Acids*. 1te Aufl. New York: Plenum Press, 11-25.
- Farooqui AA, Rosenberger TA, Horrocks LA. 1997a. Arachidonic acid, neurotrauma and neurodegenerative diseases. In: Mostofsky DI, Yehuda S, Hrsg. *Fatty Acids: Biochemistry Nd Behavior*. 1te Aufl. Totowa, New Jersey: Humana Press, 277-295.
- Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. 2000a. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids*, 106:1-29.
- Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. 2000b. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids*, 106 (1):1-29.
- Farooqui AA, Ong WY, Horrocks LA. 2004. Biochemical aspects of neurodegeneration in human brain: involvement of neural membrane phospholipids and phospholipases A2. *Neurochem Res*, 29 (11):1961-1977.
- Farooqui AA, Yang HC, Rosenberger TA, Horrocks LA. 1997b. Phospholipase A2 and its role in brain tissue. *J Neurochem*, 69 (3):889-901.
- Folstein MF, Folstein SE, Hugh PR. 1975. "Mini-Mental State". A practical method for grading the cognitive state of ptients for the clinican. *J Psychiatr Res*, 12:189-198.
- Forette F, Seux ML, Staessen JA, Thijs L, Babarskiene MR, Babeanu Sea. 2002. The prevention of dementia with antihypertensive treatment: new evidence from the Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) study. *Arch Intern Med*, 162:2046-2052.
- Forlenza OV, Wacker P, Nunes PV, Yacubian J, Castro CC, Otaduy MC, Gattaz WF. 2005. Reduced phospholipid breakdown in Alzheimer's brains: a 31P spectroscopy study. *Psychopharmacology (Berl)*, 180 (2):359-365.
- Förstl H, Hüll M. 2004. Organische (und symptomatische) psychische Störungen. In: Berger M, Hecht H, Hrsg. *Psychische Erkrankungen Klinik und Therapie*. 2te Aufl. München: Elsevier GmbH, 301-388.
- Fratiglioni L, Launer LJ, Andersen K. 2000. Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurology*, 54 (11):10-15.

- Friedlander RM. 2003. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med*, 348 (14):1365-1375.
- Fujita S, Ikegaya Y, Nishiyama N, Matsuki N. 2000. Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 inhibitor impairs spatial memory of mice. *Jpn J Pharmacol*, 83 (3):277-278.
- Fujita S, Ikegaya Y, Nishikawa M, Nishiyama N, Matsuki N. 2001. Docosahexaenoic acid improves long-term potentiation attenuated by phospholipase A(2) inhibitor in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol*, 132 (7):1417-1422.
- Fukushima D, Konishi M, Maruyama K, Miyamoto T, Ishiura S, Suzuki K. 1993. Activation of the secretory pathway leads to a decrease in the intracellular amyloidogenic fragments generated from the amyloid protein precursor. *Biochem Biophys Res Commun*, 194 (1):202-207.
- Gattaz WF, Schmitt A, Maras A. 1995a. Increased platelet phospholipase A2 activity in schizophrenia. *Schizophr Res*, 16 (1):1-6.
- Gattaz WF, Maras A, Cairns NJ, Levy R, Forstl H. 1995b. Decreased phospholipase A2 activity in Alzheimer brains. *Biol Psychiatry*, 37 (1):13-17.
- Gattaz WF, Forlenza OV, Talib LL, Barbosa NR, Bottino CM. 2004. Platelet phospholipase A(2) activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J Neural Transm*, 111 (5):591-601.
- Gattaz WF, Cairns NJ, Levy R, Forstl H, Braus DF, Maras A. 1996. Decreased phospholipase A2 activity in the brain and in platelets of patients with Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 246 (3):129-131.
- Gerst JL, Siedlak SL, Nunomura A, Castellani R, Perry G, Smith MA. 1999. Role of oxidative stress in frontotemporal dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 10 Suppl 1:85-87.
- Gonzalez RG, Guimaraes AR, Moore GJ, Crawley A, Cupples LA, Growdon JH. 1996. Quantitative in vivo 31P magnetic resonance spectroscopy of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 10 (1):46-52.
- Gsell W, Strein I, Riederer P. 1996. The neurochemistry of Alzheimer type, vascular type and mixed type dementias compared. *J Neural Transm Suppl*, 47:73-101.
- Gsell W, Jungkunz G, Riederer P. 2004. Functional neurochemistry of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des*, 10 (3):265-293.
- Haass C, Selkoe DJ. 1993. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell*, 75 (6):1039-1042.
- Haberl RL, Schreiber AK. 2005. Vaskuläre Demenzen. In: Wallesch CW, Förstl H, Hrsg. Demenzen. 1te Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 221-228.
- Hajimohammadreza I, Brammer M. 1990. Brain membrane fluidity and lipid peroxidation in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 112 (2-3):333-337.
- Hajimohammadreza I, Brammer MJ, Eagger S, Burns A, Levy R. 1990. Platelet and erythrocyte membrane changes in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1025 (2):208-214.
- Halliwell B. 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*, 52:253-265.
- Härtig C, Markowitch HJ, Neufeld H, Calabrese P, Deisinger K, Kessler J, Hrsg. 2000. WMS-R Wechsler Gedächtnistest - Revidierte Fassung. Deutsche Adaptation der revidierten Fassung der Wechsler Memory Scale. Manual. 1te Aufl. Bern: Huber.
- Hedqvist PO. 1978. Prostaglandin-mediated prejunctional regulation of adrenergic neurotransmission. *Biochem Soc Trans*, 6 (4):714-717.
- Hentschel F, Supprian T, Frölich L. 2005. Alzheimer Demenz versus vaskuläre Demenz - Dichotomie oder Interaktion? *Fortschr Neurol Psychiatr*, 73:317-326.
- Higgins JP, Flicker L. 2003. Lecithin for dementia and cognitive impairment. *Cochrane Database Syst Rev*, (3):CD001015.

- Hofman A, Grobbee DE, de Jong PT, van den Ouweland FA. 1991. Determinants of disease and disability in the elderly: the Rotterdam Elderly Study. *Eur J Epidemiol*, 7:403-422.
- Holscher C, Rose SP. 1994. Inhibitors of phospholipase A2 produce amnesia for a passive avoidance task in the chick. *Behav Neural Biol*, 61 (3):225-232.
- Hong A. 1995. [The neural basis of learning and memory declines in aged rats]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, 26 (3):240-242.
- Horrobin DF. 1998. The membrane phospholipid hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. *Schizophr Res*, 30 (3):193-208.
- Horrobin DF, Glen AI, Vaddadi K. 1994. The membrane hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Res*, 13 (3):195-207.
- Hüll M, Schmidtke K. 2004. Vaskuläre Demenz, Alzheimer Demenz oder Mischdemenz? *Nervenheilkunde*, 2:25-32.
- Ibach B. 2005. Frontotemporale Demenzen. In: Wallesch CW, Förstl H, Hrsg. Demenzen. 1te Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 180-194.
- Igaz LM, Vianna MR, Medina JH, Izquierdo I. 2002. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci*, 22 (15):6781-6789.
- Ihara Y, Hayabara T, Sasaki K, Fujisawa Y, Kawada R, Yamamoto T, Nakashima Y, Yoshimune S, Kawai M, Kibata M, Kuroda S. 1997. Free radicals and superoxide dismutase in blood of patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neurol Sci*, 9 (153(1)):76-81.
- Izquierdo I, Medina JH. 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*, 68 (3):285-316.
- Jellinger KA. 1997. Morphological substrates of dementia in parkinsonism. A critical update. *J Neural Transm Suppl*, 51:57-82.
- Jellinger KA. 2002. Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update. *J Neural Transm*, 109 (5-6):813-836.
- Jenkins CM, Wolf MJ, Mancuso DJ, Gross RW. 2001. Identification of the calmodulin-binding domain of recombinant calcium-independent phospholipase A2beta. implications for structure and function. *J Biol Chem*, 276 (10):7129-7135.
- Jolly YC, Major C, Wolf BA. 1993. Transient activation of calcium-dependent phospholipase A2 by insulin secretagogues in isolated pancreatic islets. *Biochemistry*, 32 (45):12209-12217.
- Jorm AF, Jolley D. 1998. The incidence of dementia: a meta-analysis. *Neurology*, 51 (3):728-733.
- Jump DB, Clarke SD, Thelen A, Liimatta M. 1994. Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res*, 35 (6):1076-1084.
- Kalaria RN. 1999. The blood-brain barrier and cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 893:113-125.
- Kalaria RN, Ballard C. 1999. Overlap between pathology of Alzheimer disease and vascular dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 13 Suppl 3:S115-123.
- Kalman J, Dey I, Ilona SV, Matkovics B, Brown D, Janka Z, Farkas T, Joo F. 1994. Platelet membrane fluidity and plasma malondialdehyde levels in Alzheimer's demented patients with and without family history of dementia. *Biol Psychiatry*, 35 (3):190-194.
- Kanfer JN, McCartney DG. 1986. Reduced phosphorylcholine hydrolysis by homogenates of temporal regions of Alzheimer's brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 139 (1):315-319.

- Katila H, Appelberg B, Rimon R. 1997. No differences in phospholipase-A2 activity between acute psychiatric patients and controls. *Schizophr Res*, 26 (2-3):103-105.
- Kertesz A, Nadkarni N, Davidson W, Thomas AW. 2000. The Frontal Behavioral Inventory in the differential diagnosis of frontotemporal dementia. *JINS*, 6:460-468.
- Kessler J, Kalbe E. 2000. Gerontoneuropsychologie - Grundlagen und Pathologie. In: Sturm W, Hermann M, Wallesch CW, Hrsg. *Lehrbuch der klinischen Neuropsychologie*. Aufl. Swets & Zeitlinger, 648-662.
- Kim SS, Kim DK, Suh YH. 1997. Cerebral cortical phospholipase A2 activity of senescence-accelerated mouse is increased in an age-dependent manner. *Neurosci Res*, 29 (3):269-272.
- Kukull WA, Hinds TR, Schellenberg GD, van Belle G, Larson EB. 1992. Increased platelet membrane fluidity as a diagnostic marker for Alzheimer's disease: a test in population-based cases and controls. *Neurology*, 42 (3 Pt 1):607-614.
- Kuslys T, Vishwanath BS, Frey FJ, Frey BM. 1996. Differences in phospholipase A2 activity between males and females and Asian Indians and Caucasians. *Eur J Clin Invest*, 26 (4):310-315.
- Kwee IL, Nakada T, Ellis WG. 1991. Elevation in relative levels of brain membrane unsaturated fatty acids in Alzheimer's disease: high resolution proton spectroscopic studies of membrane lipid extracts. *Magn Reson Med*, 21 (1):49-54.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259):680-685.
- Lasch J, Willhardt I, Kinder D, Sauer H, Smesny S. 2003. Fluorometric assays of phospholipase A2 activity with three different substrates in biological samples of patients with schizophrenia. *Clin Chem Lab Med*, 41 (7):908-914.
- Lester DS, Bramham CR. 1993. Persistent, membrane-associated protein kinase C: from model membranes to synaptic long-term potentiation. *Cell Signal*, 5 (6):695-708.
- Loeb C, Gandolfo C. 1983. Diagnostic evaluation of degenerative and vascular dementia. *Stroke*, 14 (3):399-401.
- Löffler G, Petrides PE. 2003. *Biochemie und Pathobiochemie*. Siebte Aufl. Berlin: Springer.
- Mann K, Gann H, Günther A. 2004. Suchterkrankungen. In: Berger M, Hecht H, Hrsg. *Psychische Erkrankungen Klinik und Therapie*. 2te Aufl. München: Elsevier GmbH, 390-446.
- Martinez J, Moreno JJ. 2001. Role of Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 on arachidonic acid release induced by reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys*, 392 (2):257-262.
- Mattson MP. 2000. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1 (2):120-129.
- Mattson MP. 2002. Oxidative stress, perturbed calcium homeostasis, and immune dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurovirol*, 8 (6):539-550.
- Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE. 1993. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron*, 10 (2):243-254.
- McKeith IG, Galasko D, Kosaka K, Perry EK, Dickson DW, Hansen LA, Salmon DP, Lowe J, Mirra SS, Byrne EJ, Lennox G, Quinn NP, Edwardson JA, Ince PG, Bergeron C, Burns A, Miller BL, Lovestone S, Collerton D, Jansen EN, Ballard C, de Vos RA, Wilcock GK, Jellinger KA, Perry RH. 1996. Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology*, 47 (5):1113-1124.

- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 34 (7):939-944.
- McLaurin J, Chakrabartty A. 1997. Characterization of the interactions of Alzheimer beta-amyloid peptides with phospholipid membranes. *Eur J Biochem*, 245 (2):355-363.
- McLean LR, Hagaman KA, Davidson WS. 1993. Role of lipid structure in the activation of phospholipase A<sub>2</sub> by peroxidized phospholipids. *Lipids*, 28:505-509.
- Mecocci P, Beal MF, Cecchetti R, Polidori MC, Cherubini A, Chionne F, Avellini L, Romano G, Senin U. 1997. Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged and AD human brain. *Mol Chem Neuropathol*, 31 (1):53-64.
- Memon RA, Fuller J, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. 1999. In vivo regulation of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase during the acute phase response. *Am J Physiol*, 277 (1 Pt 2):R94-103.
- Milward EA, Papadopoulos R, Fuller SJ, Moir RD, Small D, Beyreuther K, Masters CL. 1992. The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron*, 9 (1):129-137.
- Morton RA, Kuenzi FM, Fitzjohn SM, Rosahl TW, Smith D, Zheng H, Shearman M, Collingridge GL, Seabrook GR. 2002. Impairment in hippocampal long-term potentiation in mice under-expressing the Alzheimer's disease related gene presenilin-1. *Neurosci Lett*, 319 (1):37-40.
- Moskowitz N, Schook W, Puszkin S. 1982. Interaction of brain synaptic vesicles induced by endogenous Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipase A<sub>2</sub>. *Science*, 216 (4543):305-307.
- Muccioli G, Raso GM, Ghe C, Di Carlo R. 1996. Effect of L-alpha glycerylphosphorylcholine on muscarinic receptors and membrane microviscosity of aged rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 20 (2):323-339.
- Mulder C, Wahlund LO, Teerlink T, Blomberg M, Veerhuis R, van Kamp GJ, Scheltens P, Scheffer PG. 2003. Decreased lysophosphatidylcholine/phosphatidylcholine ratio in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 110 (8):949-955.
- Müller WE, Koch S, Scheuer K, Rostock A, Bartsch R. 1997. Effects of piracetam on membrane fluidity in the aged mouse, rat, and human brain. *Biochem Pharmacol*, 53 (2):135-140.
- Newens AJ, Forster DP, Kay DW, Kirkup W, Bates D, Edwardson J. 1993. Clinically diagnosed presenile dementia of the Alzheimer type in the Northern Health Region: ascertainment, prevalence, incidence and survival. *Psychol Med*, 23 (3):631-644.
- Nishizaki T, Nomura T, Matsuoka T, Enikolopov G, Sumikawa K. 1999. Arachidonic acid induces a long-lasting facilitation of hippocampal synaptic transmission by modulating PKC activity and nicotinic ACh receptors. *Brain Res Mol Brain Res*, 69 (2):263-272.
- Nitsch RM, Blusztajn JK, Pittas AG, Slack BE, Growdon JH, Wurtman RJ. 1992. Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (5):1671-1675.
- Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. 2001. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60 (8):759-767.
- Orgogozo JM, Rigaud AS, Stoffler A, Mobius HJ, Forette F. 2002. Efficacy and safety of memantine in patients with mild to moderate vascular dementia: a randomized, placebo-controlled trial (MMM 300). *Stroke*, 33:1834-1839.

- Oswald WD, Fleischmann UM. 1999. Nürnberger-Alters-Inventar (NAI). Testmanual und Textband. 4te Aufl. Göttingen: Hogrefe.
- Paragh G, Balla P, Katona E, Seres I, Egerhazi A, Degrell I. 2002. Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 252 (2):63-67.
- Pasquier F, Leys D. 1997. Why are stroke patients prone to develop dementia? *J Neurol*, 244 (3):135-142.
- Pasquier F, Leys D, Scheltens P. 1998. The influence of coincidental vascular pathology on symptomatology and course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*, 54:117-127.
- Peet M, Horrobin DF. 2002. A dose-ranging exploratory study of the effects of ethyl-eicosapentaenoate in patients with persistent schizophrenic symptoms. *J Psychiatr Res*, 36 (1):7-18.
- Perry G, Cash AD, Smith MA. 2002. Alzheimer's disease and oxidative stress. *J Biomed Biotechnol*, 2:120-123.
- Pettegrew JW, Panchalingam K, Hamilton RL, McClure RJ. 2001. Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*, 26 (7):771-782.
- Pettegrew JW, Klunk WE, Panchalingam K, McClure RJ, Stanley JA. 1997. Magnetic resonance spectroscopic changes in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 826:282-306.
- Pilitsis JG, Diaz FG, O'Regan MH, Phillis JW. 2002. Differential effects of phospholipase inhibitors on free fatty acid efflux in rat cerebral cortex during ischemia-reperfusion injury. *Brain Res*, 951 (1):96-106.
- Piomelli D. 1993. Arachidonic acid in cell signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 5:274-280.
- Pletscher A. 1986. Blood platelets as neuronal models: use and limitations. *Clin Neuropharmacol*, 9:344-346.
- Pohjasvaara T, Mantyla R, Ylikoski R, Kaste M, Erkinjuntti T. 2003. Clinical features of MRI-defined subcortical vascular disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 17:236-242.
- Prasad MR, Lovell MA, Yatin M, Dhillon H, Markesbery WR. 1998. Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*, 23 (1):81-88.
- Pratt RD, Perdomo CA. 2002. Donepezil-treated patients with probable vascular dementia demonstrate cognitive benefits. *Ann N Y Acad Sci*, 977:513-522.
- Ray P, Ishida H, Millard CB, Petrali JP, Ray R. 1999. Phospholipase A2 and arachidonic acid-mediated mechanism of neuroexocytosis: a possible target of botulinum neurotoxin A other than SNAP-25. *J Appl Toxicol*, 19 Suppl 1:S27-28.
- Reiber H. 2005. Liquordiagnostik. In: Thomas L, Hrsg. "Labor und Diagnose" Indikationen und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 6te Aufl. Th-Books, 1743-1784.
- Reichmann H, Sommer U. 2001. Demenz beim idiopathischen Parkinson-Syndrom. *Akt Neurol*, 28 (3):228-230.
- Rocca WA, Cha RH, Waring SC. 1998. Incidence of dementia and Alzheimer's disease: a reanalysis of data from Rochester, Minnesota, 1975-1984. *American Journal of Epidemiology*, 148:51-62.
- Roman GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, Cummings JL, Masdeu JC, Garcia JH, Amaducci L, Orgogozo JM, Brun A, Hofman A, et al. 1993. Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology*, 43 (2):250-260.
- Rosenberger TA, Villacreses NE, Contreras MA, Bonventre JV, Rapoport SI. 2003. Brain lipid metabolism in the cPLA2 knockout mouse. *J Lipid Res*, 44 (1):109-117.



- Ross BM, Moszczynska A, Erlich J, Kish SJ. 1998. Phospholipid-metabolizing enzymes in Alzheimer's disease: increased lysophospholipid acyltransferase activity and decreased phospholipase A2 activity. *J Neurochem*, 70 (2):786-793.
- Ross MA. 2000. Could oxidative stress be a factor in neurodevelopmental disorders? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 63 (1-2):61-63.
- Salgo MG, Corongiu FP, Sevanian A. 1993. Enhanced interfacial catalysis and hydrolytic specificity of phospholipase A2 toward peroxidized phosphatidylcholine vesicles. *Arch Biochem Biophys*, 304 (1):123-132.
- Satzger W, Hampel H, Padberg F. 2001. Zur praktischen Anwendung der CERAD-Testbatterie als neuropsychologisches Demenzscreening. *Nervenarzt*, 72:196-203.
- Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, Smith MA. 1997. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 68 (5):2092-2097.
- Schaeffer EL, Bassi F, Jr., Gattaz WF. 2005. Inhibition of phospholipase A2 activity reduces membrane fluidity in rat hippocampus. *J Neural Transm*, 112 (5):641-647.
- Scheffer PG, Bakker SJ, Popp-Snijders C, Heine RJ, Schutgens RB, Teerlink T. 2001. Composition of LDL as determinant of its susceptibility to in vitro oxidation in patients with well-controlled type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 17 (6):459-466.
- Scheuer K, Rostock A, Bartsch R, Muller WE. 1999. Piracetam improves cognitive performance by restoring neurochemical deficits of the aged rat brain. *Pharmacopsychiatry*, 32 Suppl 1:10-16.
- Schlegel J. 2005. Neuropathologie der Demenzen. In: Wallesch CW, Förstl H, Hrsg. Demenzen. 1te Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 43-58.
- Scott RB, Collins JM, Hunt PA. 1994. Alzheimer's disease and Down syndrome: leukocyte membrane fluidity alterations. *Mech Ageing Dev*, 75 (1):1-10.
- Seigerschmidt E, Mösch E, Siemen M, Förstl H, Bickel H. 2002. The clock drawing test and questionable dementia: Reliability and validity. *Int J Geriatr Psychiatry*, 17:1048-1054.
- Shivers BD, Hilbich C, Multhaup G, Salbaum M, Beyreuther K, Seeburg PH. 1988. Alzheimer's disease amyloidogenic glycoprotein: expression pattern in rat brain suggests a role in cell contact. *Embo J*, 7 (5):1365-1370.
- Six DA, Dennis EA. 2000. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*, 1488 (1-2):1-19.
- Smalheiser NR, Dissanayake S, Kapil A. 1996. Rapid regulation of neurite outgrowth and retraction by phospholipase A2-derived arachidonic acid and its metabolites. *Brain Res*, 721 (1-2):39-48.
- Smesny S, Kinder D, Willhardt I, Rosburg T, Lasch J, Berger G, Sauer H. 2005. Increased Calcium-Independent Phospholipase A2 Activity in First but Not in Multiphase Chronic Schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 57:399-405.
- Staehelin HB. 2004. Epidemiologie der Demenzerkrankungen. *Schweiz Med Forum*, 4:247-250.
- Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM. 1987. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Purification and properties. *J Biol Chem*, 262 (9):4223-4230.
- Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. 1997. Platelet-activating factor acetylhydrolases. *J Biol Chem*, 272 (29):17895-17898.
- Steer SA, Wirsig KC, Creer MH, Ford DA, McHowat J. 2002. Regulation of membrane-associated iPLA2 activity by a novel PKC isoform in ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283 (6):C1621-1626.
- Stephenson D, Rash K, Smalstig B, Roberts E, Johnstone E, Sharp J, Panetta J, Little S, Kramer R, Clemens J. 1999. Cytosolic phospholipase A2 is induced in reactive glia following different forms of neurodegeneration. *Glia*, 27 (2):110-128.

- Stephenson DT, Lemere CA, Selkoe DJ, Clemens JA. 1996. Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) immunoreactivity is elevated in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis*, 3 (1):51-63.
- Sun GY, Xu J, Jensen MD, Simonyi A. 2004. Phospholipase A<sub>2</sub> in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *Lipid Res*, 45 (2):205-213.
- Tabet N, Feldmand H. 2003. Ibuprofen for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, (2):CD004031.
- Takuma K, Yan SS, Stern DM, Yamada K. 2005. Mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis in Alzheimer's disease. *J Pharmacol Sci*, 97 (3):312-316.
- Talbot K, Young RA, Jolly-Tornetta C, Lee VM, Trojanowski JQ, Wolf BA. 2000. A frontal variant of Alzheimer's disease exhibits decreased calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> activity in the prefrontal cortex. *Neurochem Int*, 37 (1):17-31.
- Tavares H, Yacubian J, Talib LL, Barbosa NR, Gattaz WF. 2003. Increased phospholipase A<sub>2</sub> activity in schizophrenia with absent response to niacin. *Schizophr Res*, 61 (1):1-6.
- Thuren T, Virtanen JA, Lalla M, Kinnunen PK. 1985. Fluorometric assay for phospholipase A<sub>2</sub> in serum. *Clin Chem*, 31 (5):714-717.
- Tohgi H, Abe T, Kimura M, Saheki M, Takahashi S. 1996. Cerebrospinal fluid acetylcholine and choline in vascular dementia of Binswanger and multiple small infarct types as compared with Alzheimer-type dementia. *J Neural Transm*, 103 (10):1211-1220.
- Tomassoni ML, Amori D, Magni MV. 1999. Changes of nuclear membrane lipid composition affect RNA nucleocytoplasmic transport. *Biochem Biophys Res Commun*, 258 (2):476-481.
- Tomimoto H, Ohtani R, Shibata M, Nakamura N, Ihara M. 2005. Loss of cholinergic pathways in vascular dementia of the Binswanger type. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 19 (5-6):282-288.
- van den Berg JJ, Op den Kamp JA, Lubin BH, Kuypers FA. 1993. Conformational changes in oxidized phospholipids and their preferential hydrolysis by phospholipase A<sub>2</sub>: a monolayer study. *Biochemistry*, 32 (18):4962-4967.
- Van Everbroeck B, Dobbeleir I, De Waele M, De Leenheir E, Lubke U, Martin JJ, Cras P. 2004. Extracellular protein deposition correlates with glial activation and oxidative stress in Creutzfeldt-Jakob and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)*, 108 (3):194-200.
- van Oijen M, van der Meer IM, Hofman A, Witteman JC, Koudstaal PJ, Breteler MM. 2006. Lipoprotein associated phospholipase A<sub>2</sub> is associated with risk of dementia. *Ann Neurol*, 59 (1):139-144.
- van Veen M, O'Shea P. 1995. The interaction of the neurodegenerative fragment of the beta-amyloid peptide with phospholipid membranes. *Biochem Soc Trans*, 23 (4):547S.
- Vermeer SE, Prins ND, den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. 2003. Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *N Engl J Med*, 348 (13):1215-1222.
- Wakabayashi S, Freed LM, Bell JM, Rapoport SI. 1994. In vivo cerebral incorporation of radiolabeled fatty acids after acute unilateral orbital enucleation in adult hooded Long-Evans rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 14 (2):312-323.
- Wallesch CW, Förstl H. 2005. Demenz mit Lewy-Körperchen. In: Wallesch CW, Förstl H, Hrsg. *Demenzen*. 1te Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 175-178.
- Walling A, Allafuzoff I, Carlsson A. 1989. Neurotransmitter deficits in a non-multi-infarct category of vascular dementia. *Acta Neurol Scand*, 79:397-406.
- Walter A, Korth U, Hilgert M, Hartmann J, Weichel O, Fassbender K, Schmitt A, Klein J. 2004. Glycerophosphocholine is elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *Neurobiol Aging*, 25 (10):1299-1303.

- Webber KM, Bowen R, Casadesus G, Perry G, Atwood CS, Smith MA. 2004. Gonadotropins and Alzheimer's disease: the link between estrogen replacement therapy and neuroprotection. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 64:113-118.
- Weerasinghe G, Coon S, Bhattacharjee A, Harry G, Bosetti F. 2006. Regional protein levels of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 in Rhesus monkey brain as a function of age. *Brain Res Bull*, 69 (6):614-621.
- Williams JH, Errington ML, Lynch MA, Bliss TV. 1989. Arachidonic acid induces a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. *Nature*, 341 (6244):739-742.
- Williams WM, Chang MC, Rapoport SI. 1994. Cerebral microvessel phospholipase A2 activity in senescent mouse. *Neurochem Res*, 19 (3):317-320.
- Williamson P, Schlegel RA. 2002. Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells. *Biochim Biophys Acta*, 1585 (2-3):53-63.
- Wolf H, Gertz HJ. 2004. Vaskuläre Demenzen - Diagnostik, Prävention und Therapie. *Psychiatr Prax*, 31:330-338.
- Wolf MJ, Izumi Y, Zorumski CF, Gross RW. 1995. Long-term potentiation requires activation of calcium-independent phospholipase A2. *FEBS Lett*, 377 (3):358-362.
- Wolf MJ, Wang J, Turk J, Gross RW. 1997. Depletion of intracellular calcium stores activates smooth muscle cell calcium-independent phospholipase A2. A novel mechanism underlying arachidonic acid mobilization. *J Biol Chem*, 272 (3):1522-1526.
- Wolfram H, Wiczorek V. 1990. Zur Messung des prämorbidem Leistungsniveaus. *Nervenarzt*, 61:495-498.
- Xu J, Yu S, Sun AY, Sun GY. 2003. Oxidant-mediated AA release from astrocytes involves cPLA(2) and iPLA(2). *Free Radic Biol Med*, 34 (12):1531-1543.
- Yang HC, Mosior M, Johnson CA, Chen Y, Dennis EA. 1999. Group-specific assays that distinguish between the four major types of mammalian phospholipase A2. *Anal Biochem*, 269 (2):278-288.
- Yeagle PL. 1989. Lipid regulation of cell membrane structure and function. *Faseb J*, 3 (7):1833-1842.
- Zhang JP, Sun GY. 1995. Focal cerebral ischemia- and reperfusion-induced changes in free fatty acids, neutral glycerides and phosphoglycerides in rat brain cortex. *J Neurochem*, 64:1688-1695.
- Zubenko GS. 1986. Hippocampal membrane alteration in Alzheimer's disease. *Brain Res*, 385 (1):115-121.
- Zubenko GS, Cohen BM, Reynolds CF, 3rd, Boller F, Malinakova I, Keefe N. 1987. Platelet membrane fluidity in Alzheimer's disease and major depression. *Am J Psychiatry*, 144 (7):860-868.
- Zubenko GS, Winwood E, Jacobs B, Teply I, Stiffler JS, Hughes HB, 3rd, Huff FJ, Sunderland T, Martinez AJ. 1999. Prospective study of risk factors for Alzheimer's disease: results at 7.5 years. *Am J Psychiatry*, 156 (1):50-57.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Anteil demenzieller Erkrankungen am Gesamtspektrum nach Angaben von Staehelin 2004....	2
Abb. 2 Membranmodell von Singer und Nicolson (Löffler und Petrides 2003).....	14
Abb. 3 Phospholipid und Angriffspunkt der PLA <sub>2</sub> modifiziert nach Farooqui et al. 2000.....	15
Abb. 4 Funktionen der Phospholipase A <sub>2</sub> .....	17
Abb. 5 Fas-induzierte Apoptose modifiziert nach Farooqui et al. 2004.....	23
Abb. 6 Regulationsmechanismen der iPLA <sub>2</sub> (Akiba und Sato 2004).....	24
Abb. 7 Wirkung der PLA <sub>2</sub> und ihrer Produkte modifiziert nach Farooqui et al. 1997 b.....	26
Abb. 8 Strukturformel des NBD-PC mit fluorogener Gruppe NBD-X (grau unterlegt).....	41
Abb. 9 Spaltung des NBD-PCs durch die iPLA <sub>2</sub> .....	42
Abb. 10 Dünnschichtchromatographie auf HPTLC-Platte.....	43
Abb. 11 Eichkurve: integrierte Lichtintensität (ILI) zur Konzentration von NBD-X.....	44
Abb. 12 Phospholipaseaktivität im Liquor bei Verwendung des Substrates NBD-PC.....	47
Abb. 13 Auftrennung des konzentrierten Liquores.....	49
Abb. 14 Gelelektrophorese Fraktion 7, Fraktion 47 und des konzentrierten Liquors.....	50
Abb. 15 PLA <sub>2</sub> -Aktivität der Fraktionen der Säulentrennung.....	51
Abb. 16 Elektrophoretische Übereinstimmung Serum-PLA <sub>2</sub> (Bahn 1) mit Liquor-PLA <sub>2</sub> (Bahn 2).....	52
Abb. 17 Anteil der einzelnen demenziellen Erkrankungen am Gesamtspektrum.....	54
Abb. 18 iPLA <sub>2</sub> -Aktivität (Liquor) Alzheimer Demenz vs. Kontrollgruppe.....	56
Abb. 19 iPLA <sub>2</sub> -Aktivität (Liquor) Vaskuläre Demenz vs. Kontrollgruppe.....	57
Abb. 20 iPLA <sub>2</sub> -Aktivität (Liquor) Demenz vom Mischtyp vs. Kontrollgruppe.....	58
Abb. 21 iPLA <sub>2</sub> -Aktivität (Liquor) Alzheimer Demenz und Demenz Mischtyp vs. Kontrollgruppe.....	59
Abb. 22 Teilzusammenfassung: iPLA <sub>2</sub> -Aktivität (Liquor) der Hauptdemenzformen vs. KG.....	60
Abb. 23 iPLA <sub>2</sub> -Aktivität (Liquor/ Serum) nach Schweregrad der AD-AVD-Gruppe.....	61
Abb. 24 Scatterplot zur Korrelationsanalyse zwischen den iPLA <sub>2</sub> -Aktivitäten in Liquor und Serum...	62
Abb. 25 Scatterplot zur Korrelationsanalyse zwischen iPLA <sub>2</sub> -Aktivität (Liquor) und Patientenalter...	63
Abb. 26 Scatterplot zur Korrelationsanalyse zwischen iPLA <sub>2</sub> -Aktivität (Serum) und Patientenalter...	63
Abb. 27 iPLA <sub>2</sub> -Aktivität (Liquor/ Serum) im Vergleich Frontotemporale Demenz vs. KG.....	65
Abb. 28 iPLA <sub>2</sub> -Aktivität (Liquor/ Serum) der Patienten mit Lewy-Körper-Demenz vs. KG.....	66
Abb. 29 iPLA <sub>2</sub> -Aktivität (Liquor/ Serum) Demenz mit Normaldruckhydrozephalus vs. KG.....	67
Abb. 30 iPLA <sub>2</sub> -Aktivitäten (Liquor/ Serum) der Patienten mit Korsakow-Syndrom vs. KG.....	68
Abb. 31 iPLA <sub>2</sub> -Aktivität (Liquor/ Serum) einzelner Demenzformen im Vgl. zur KG.....	69

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1 aus Phospholipiden gewonnene Second Messenger .....	25
Tab. 2 Studien zur PLA <sub>2</sub> im Kontext der AD.....	27
Tab. 3 Epidemiologische Daten zur untersuchten Gruppe.....	36
Tab. 4 Gruppengrößen der in drei Schweregrade unterteilten AD, VD und AVD .....	37
Tab. 5 Einfluss von Ca <sup>2+</sup> und EGTA auf die PLA <sub>2</sub> -Aktivität modifiziert nach Lasch et al. 2003 .....	45
Tab. 6 Einfluss von Ca <sup>2+</sup> und EGTA auf die PLA <sub>2</sub> -Aktivität (Liquor) .....	46

## Anhang

### Aufbau der Befunderfassungstabelle und Beschreibung der Variablen

Variable	Erläuterung
probe	Nummer der Probe
proband	Name des Probanden
sex	Geschlecht des Probanden
gebdat	Geburtsdatum des Probanden
alter	Probandenalter z.Z. der Probenentnahme
gruppe	Kontrollgruppe bzw. Patientengruppe
anfam	Familienanamnese bzgl. psychiatr., neurolog. und kardiovask. Erkrankungen
aneig	Eigenanamnese bzgl. psychiatr., neurolog. und kardiovask. Erkrankungen
vaskrf	Vaskuläre Risikofaktoren
neuropsych	Neuropsychologischer Befund
mmst	Ergebnis im MMST z.Z. der Liquordiagnostik
mmstplus	weitere Ergebnisse im MMST
orient	Orientierung
halluz	Halluzinationen
stimmg	Stimmung z.Z. der Exploration
affekt	Affekt
psyerkr	weitere psychiatrische Symptome/ Erkrankungen
neurerkr	neurologische Symptome/ Erkrankungen
sensnl	Sensitivität gegenüber Neuroleptika
verlauf	bisheriger Verlauf der demenziellen Entwicklung
bilder	Befunde der bildgebenden Diagnostik
elphys	Befunde der elektrophysiologischen Diagnostik
serol	wichtige Serologiebefunde
protli	Gesamtprotein im Liquor in mg/l
zellenli	Zellzahl im Liquor / $\mu$ l
diffzeli	Differentialzellbild im Liquor in %
iggband	oligoklonale IgG Banden im Liquor
amyges	$\beta$ -Amyloid 40 + 42 im Liquor in pg/ml
amy40	$\beta$ -Amyloid 40 im Liquor in pg/ml
amy42	$\beta$ -Amyloid 42 im Liquor in pg/ml
quamy	Quotient $\beta$ -Amyloid 42/40 im Liquor
tau	phosphoryliertes Tau-Protein im Liquor in pg/ml
qutauamy	phosphoryliertes Tau-Protein/ $\beta$ -Amyloid 42
cjdprot	Protein 14-3-3 im Liquor
sprotse	Protein S-100 im Serum in $\mu$ g/l
sprotli	Protein S-100 im Liquor in $\mu$ g/l
enolase	neuronenspezifische Enolase im Serum in $\mu$ g/l
enolali	neuronenspezifische Enolase im Liquor in $\mu$ g/l
apoe	Apolipoprotein E-Genotyp
vitamine	Vitaminmangel
antidem	vom Probanden eingenommene Antidementiva
coxhe	vom Probanden eingenommene COX-Hemmer
diagakte	Demenzdiagnose laut Krankenakte
diageig	eigene Demenzdiagnose
schwere	Schweregrad der Demenz
entndat	Entnahmedatum des auf PLA <sub>2</sub> -Aktivität untersuchten Blutes/ Liquors
bestdat	Datum der Bestimmung der PLA <sub>2</sub> -Aktivität
plaaktse	Pla-2-Aktivität im Serum in pmol min*mgEW
plaaktli	Pla-2-Aktivität im Liquor in pmol/min*mgEW

**ICD 10 (Deutsches Institut für medizinische Dokumentation und Information 2004)****F00\*      Demenz bei Alzheimer-Krankheit**

Die Alzheimer-Krankheit ist eine primär degenerative zerebrale Krankheit mit unbekannter Ätiologie und charakteristischen neuropathologischen und neurochemischen Merkmalen. Sie beginnt meist schleichend und entwickelt sich langsam aber stetig über einen Zeitraum von mehreren Jahren.

**F00.0\*      Demenz bei Alzheimer-Krankheit, mit frühem Beginn (Typ 2)**

Demenz bei Alzheimer-Krankheit mit Beginn vor dem 65. Lebensjahr. Der Verlauf weist eine vergleichsweise rasche Verschlechterung auf, es bestehen deutliche und vielfältige Störungen der höheren kortikalen Funktionen.

Alzheimer-Krankheit, Typ 2

Präsenile Demenz vom Alzheimer-Typ

Primär degenerative Demenz vom Alzheimer-Typ, präseniler Beginn

**F00.1\*      Demenz bei Alzheimer-Krankheit, mit spätem Beginn (Typ 1)**

Demenz bei Alzheimer-Krankheit mit Beginn ab dem 65. Lebensjahr, meist in den späten 70er Jahren oder danach, mit langsamer Progredienz und mit Gedächtnisstörungen als Hauptmerkmal.

Alzheimer-Krankheit, Typ 1

Primär degenerative Demenz vom Alzheimer-Typ, seniler Beginn

Senile Demenz vom Alzheimer-Typ (SDAT)

**F00.2\*      Demenz bei Alzheimer-Krankheit, atypische oder gemischte Form**

Atypische Demenz vom Alzheimer-Typ

**F00.9\*      Demenz bei Alzheimer-Krankheit, nicht näher bezeichnet****F01      Vaskuläre Demenz**

Die vaskuläre Demenz ist das Ergebnis einer Infarzierung des Gehirns als Folge einer vaskulären Krankheit, einschließlich der zerebrovaskulären Hypertonie. Die Infarkte sind meist klein, kumulieren aber in ihrer Wirkung. Der Beginn liegt gewöhnlich im späteren Lebensalter.

*Inkl.:*      Arteriosklerotische Demenz

**F01.0      Vaskuläre Demenz mit akutem Beginn****F01.1      Multiinfarkt-Demenz**

Sie beginnt allmählich, nach mehreren vorübergehenden ischämischen Episoden (TIA), die eine Anhäufung von Infarkten im Hirngewebe verursachen.

Vorwiegend kortikale Demenz

- F01.2 Subkortikale vaskuläre Demenz
- Hierzu zählen Fälle mit Hypertonie in der Anamnese und ischämischen Herden im Marklager der Hemisphären. Im Gegensatz zur Demenz bei Alzheimer-Krankheit, an die das klinische Bild erinnert, ist die Hirnrinde gewöhnlich intakt.
- F01.3 Gemischte kortikale und subkortikale vaskuläre Demenz
- F01.8 Sonstige vaskuläre Demenz
- F01.9 Vaskuläre Demenz, nicht näher bezeichnet
- F02\* **Demenz bei anderenorts klassifizierten Krankheiten**
- Formen der Demenz, bei denen eine andere Ursache als die Alzheimer-Krankheit oder eine zerebrovaskuläre Krankheit vorliegt oder vermutet wird. Sie kann in jedem Lebensalter auftreten, selten jedoch im höheren Alter.
- F02.0\* Demenz bei Pick-Krankheit
- Eine progrediente Demenz mit Beginn im mittleren Lebensalter, charakterisiert durch frühe, langsam fortschreitende Persönlichkeitsänderung und Verlust sozialer Fähigkeiten. Die Krankheit ist gefolgt von Beeinträchtigungen von Intellekt, Gedächtnis und Sprachfunktionen mit Apathie, Euphorie und gelegentlich auch extrapyramidalen Phänomenen.
- F02.1\* Demenz bei Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
- Eine progrediente Demenz mit vielfältigen neurologischen Symptomen als Folge spezifischer neuropathologischer Veränderungen, die vermutlich durch ein übertragbares Agens verursacht werden. Beginn gewöhnlich im mittleren oder höheren Lebensalter, Auftreten jedoch in jedem Erwachsenenalter möglich. Der Verlauf ist subakut und führt innerhalb von ein bis zwei Jahren zum Tode.
- F02.2\* Demenz bei Chorea Huntington
- Eine Demenz, die im Rahmen einer ausgeprägten Hirndegeneration auftritt. Die Störung ist autosomal dominant erblich. Die Symptomatik beginnt typischerweise im dritten und vierten Lebensjahrzehnt. Bei langsamer Progredienz führt die Krankheit meist innerhalb von 10 - 15 Jahren zum Tode.
- Demenz bei Huntington-Krankheit
- F02.3\* Demenz bei primärem Parkinson-Syndrom
- Eine Demenz, die sich im Verlauf einer Parkinson-Krankheit entwickelt. Bisher konnten allerdings noch keine charakteristischen klinischen Merkmale beschrieben werden.
- Demenz bei:
- Paralysis agitans
  - Parkinsonismus oder Parkinson-Krankheit
- F02.4\* Demenz bei HIV-Krankheit [Humane Immundefizienz-Viruskrankheit]
- Eine Demenz, die sich im Verlauf einer HIV-Krankheit entwickelt, ohne gleichzeitige andere Krankheit oder Störung, die das klinische Bild erklären könnte.



F02.8\* Demenz bei anderenorts klassifizierten Krankheitsbildern

Demenz bei:

- Epilepsie
- hepatolentikulärer Degeneration [M. Wilson]
- Hyperkalzämie
- Hypothyreose, erworben
- Intoxikationen
- Multipler Sklerose
- Neurosyphilis
- Niazin-Mangel [Pellagra]
- Panarteriitis nodosa
- systemischem Lupus erythematodes
- Trypanosomiasis
- Vitamin-B<sub>12</sub>-Mangel
- zerebraler Lipidstoffwechselstörung

F03 **Nicht näher bezeichnete Demenz**

Präsenil:

- Demenz o.n.A.
- Psychose o.n.A.

Primäre degenerative Demenz o.n.A.

Senil:

- Demenz:
- depressiver oder paranoider Typus
- o.n.A.
- Psychose o.n.A.

*Exkl.:* Senile Demenz mit Delir oder akutem Verwirrtheitszustand  
Senilität o.n.A.

Lebenslauf*Persönliche Daten*

Name	Susan Reichel
Geburtsdatum	05.04.1979
Geburtsort	Schwerin
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

*Schulbildung*

1985 - 1991	Gerhart Hauptmann Schule, Schwerin
1991 - 1997	Gymnasium Fridericianum Schwerin, Abiturnote 1,5

*Ausbildung*

1997 - 2000	Ausbildung zur Physiotherapeutin an der Beruflichen Schule des Klinikums Schwerin, Abschlussnote 1,3
-------------	--

*Studium*

seit WS 2000/2001	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
SS 2005	Zweites Staatsexamen, Note 1,7
	Famulaturen: Innere Medizin, Thüringen Kliniken Rudolstadt
	Neurologie, FSU Jena
	Orthopädie/Traumatologie, St.Göran Sjukhus Stockholm
	Allgemeinmedizin, Praxis Schwerin
	Allgemeinmedizin, Hospital Maquehue Temuco (Chile)
	Praktisches Jahr: Innere Medizin, Thüringen Kliniken Rudolstadt
	Chirurgie, Südharz-Krankenhaus, Nordhausen
	Pädiatrie, Thüringen Kliniken Saalfeld

*Förderung*

seit August 2001	Stipendiatin des Evangelischen Studienwerks Villigst e.V.
------------------	---

Jena, 26.Februar 2007

### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich vielen Menschen danken, ohne deren Hilfe und Unterstützung die Idee, Planung, Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank an:

*Prof. H. Sauer* - für die Vergabe des Themas und die Unterstützung der Arbeit sowie für die Beantragung der Verlängerung meines Stipendiums.

*Dr. S. Smesny* - einen besonders großen Dank für die Möglichkeit, diese Arbeit zu schreiben und für unendlich viel ausdauernde Unterstützung und Hilfe bei der Erarbeitung des Themas, der Literaturrecherche und der inhaltlichen Korrektur der Arbeit.

*Prof. J. Lasch* - für die Möglichkeit in Halle mitarbeiten zu dürfen und die Unterstützung bei der Literaturrecherche.

*Dr. I. Willhardt* - für die Hilfe bei der Datenerhebung, für die geduldige Bewältigung der methodischen Probleme insbesondere zur Identifizierung der iPLA<sub>2</sub> in Serum und Liquor und die immer verständlichen Erläuterungen zu biochemischen Fragestellungen.

*Frau Kötters und Frau Kirchner* - für die Laborarbeit und die interessante Zeit in Halle.

*Dr. Wolfram und Frau Meusel* - für die Durchführung der neuropsychologischen Diagnostik und die ausführliche Erläuterung bzw. Demonstration der Testverfahren.

*Frau Hemmelmann* - für die ausdauernde und immer freundliche Hilfe bei der statistischen Auswertung.

*den Mitarbeitern des Liquorlabors* - für die freundliche Bereitstellung der Zentrifuge.

*E. und G.-R. Reichel* - für die Freiheit meinen Weg gehen zu dürfen und die uneingeschränkte Unterstützung dabei.

*Michael Stein* - für seine Hilfe beim Editieren der Arbeit, seine uneingeschränkte Unterstützung und die offene Sicht auf die wirklich wichtigen Dinge des Lebens.

Außerdem danke ich der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) für die Förderung dieses Projekts.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. H. Sauer, Dr. S. Smesny, Dr. I. Willhardt und Frau Hemmelmann, die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 26.Februar 2007